

BEST AVAILABLE CO.

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification ⁶ : C12P 19/14, 19/04, A61K 31/715, C08B 37/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 99/19505</p> <p>(43) International Publication Date: 22 April 1999 (22.04.99)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US98/21361</p> <p>(22) International Filing Date: 9 October 1998 (09.10.98)</p> <p>(30) Priority Data: 60/061,681 10 October 1997 (10.10.97) US 60/098,271 28 August 1998 (28.08.98) US</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERA PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; Suite 160, 100 Technology Drive, Broomfield, CO 80021 (US).</p> <p>(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): QIU, Zhihau [CN/US]; 5840 West 112th Place, Westminster, CO 80021 (US). MAHIOU, Belaid [US/US]; 13493 Quivas Street, Westminster, CO 80234 (US).</p> <p>(74) Agents: SWANSON, Barry, J. et al.; Swanson & Bratschun, L.L.C., Suite 200, 8400 East Prentice Avenue, Englewood, CO 80111 (US).</p>		<p>(81) Designated States: JP, KR, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Published <i>With international search report.</i></p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF IMMUNOMODULATORY POLYSACCHARIDES FROM ALOE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention provides a rapid and efficient method for the preparation and isolation of biologically active polysaccharides from Aloe. The present invention includes the activated mixture of polysaccharides (referred to herein as "Immuno-10"), produced by the methods of the invention. The invention also includes the use of the polysaccharides as immunostimulating, immunomodulating and wound healing agents. The resulting immunomodulatory complex has a higher activity and is more stable than bulk carbohydrates isolated using prior art alcohol precipitation schemes.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

5

**PROCESS FOR THE PREPARATION OF IMMUNOMODULATORY
POLYSACCHARIDES FROM ALOE**

10

FIELD OF THE INVENTION

The present application relates to methods for activating and purifying polysaccharides from Aloe. In particular, the invention relates to methods for isolating polysaccharides with immunomodulatory activity from Aloe. The present invention includes the activated mixture of polysaccharides (referred to herein as "Immuno-10" or "Immuno-10 polysaccharide"), produced by the methods of the invention. The invention also includes the use of the polysaccharides as immunostimulating, immunomodulating and wound healing agents.

20

BACKGROUND OF THE INVENTION

Aloe is an intricate plant which contains many biologically active substances. (Cohen *et al.* in Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects, 1st ed. WB Saunders, Philadelphia (1992)). Over 300 species of Aloe are known, most of which are indigenous to Africa. Studies have shown that the biologically active substances are located in three separate sections of the aloe leaf --a clear gel fillet located in the center of the leaf, in the leaf rind or cortex of the leaf and in a yellow fluid contained in the pericyclic cells of the vascular bundles, located between the leaf rind and the internal gel fillet, referred to as the latex. Historically, Aloe products have been used in dermatological applications for the treatment of burns, sores and other wounds. These uses have stimulated a great deal of research on identifying compounds from Aloe that have clinical efficacy, particularly anti-inflammatory activity. (See, e.g., Grindlay and Reynolds (1986) *J. of Ethnopharmacology* 16:117-151; Hart *et al.* (1988) *J. of Ethnopharmacology* 23:61-71). As a result of these

studies there have been numerous reports of Aloe compounds having diverse biological activities, including anti-tumor activity, anti-acid activity (Hirata and Suga (1977) Z. Naturforsch 32c:731-734), anti-diabetic activity, tyrosinase inhibiting activity (Yagi *et al.* (1987) *Planta medica* 515-517) and antioxidant activity (International Application Serial
5 No. PCT/US95/07404, published December 19, 1996, publication number WO 96/40182).

It has also been reported that Aloe products can stimulate the immune system. The ability of Aloe to stimulate the immune system has been attributed to polysaccharides present in the gel. (See, e.g., Day *et al.* (1922) J. Am. Pharm. Assoc. 11:462-463; Flagg (1959) *American Perfumes and Aromatics* 74:27-28, 61; Waller *et al.* (1978) *Proc. Okla.*
10 *Acad. Sci.* 58:69-76; Shcherbukhin *et al.* (1979) *Applied Biochemistry & Microbiology* 15:892-896; Mandal *et al.* (1980) *Carbohydrate Research* 86:247-257; Mandal *et al.* (1980) *Carbohydrate Research* 87:249-256; Winters *et al.* (1981) *Eco. Botany* 35:89-95; Robson *et al.* (1982) *J. Burn Care Rehab.* 3:157-163; Ivan *et al.* (1983) *Drug & Cosmetic Ind.* 52-54, 105-106; Smothers (1983) *Drug & Cosmetic Ind.* 40:77-80; Mandal *et al.* (1983) *Indian J.*
15 *of Chem.* 22B:890-893; Vilkas *et al.* (1986) *Biochimie* 68:1123-1127; Waller *et al.* (1994) *Cosmetic Toiletries Manufacturing Worldwide* 64-80; United States Patent No. 5,308,838 of McAnalley *et al.*).

Aloe products are also used extensively in the cosmetic industry to protect skin against the harmful effects of ultraviolet radiation. (Grollier *et al.* United States Patent No.
20 4,656,029, issued April 7, 1987). Chronic exposure of the skin to ultraviolet radiation causes skin cancer in humans and laboratory animals. Exposure of the skin of laboratory animals to ultraviolet B (UVB) radiation (280-320 nm) causes suppression of the skins immune system, which impairs its ability to develop an immune response to UV-induced skin cancers, contact-sensitizing haptens and a variety of infectious microorganism. (See,
25 Strickland (1994) *J. Invest. Dermatol.* 102:197-204, and references cited therein). Studies by Strickland *et al.* show that topical application of Aloe vera gel reduces the suppression of the immune system caused by UVB exposure. (Strickland (1994) *J. Invest. Dermatol.* 102:197-204).

The ability of native gel to reduce suppression of the immune system, is very low
30 and irregular and also decreases with time. One hypothesis is that the UV-B protective factor is hydrolyzed by naturally occurring enzymes in the Aloe plant and/or by bacterial

degradation. Therefore, it would seem likely that isolating polysaccharides from Aloe would help preserve this immunomodulatory activity. Previous prior art methods for the bulk isolation of polysaccharides from Aloe, however, do not effectively preserve the immunomodulatory activity. These methods, described for example in United States Patent
5 Application Nos. 4,957,907, 4,966,892 and 5,356,811, use lengthy (4-24 hours) alcohol precipitation and centrifugation steps. Given the failure of the prior art methods to effectively preserve the immunomodulatory activity of Aloe gel, it would be useful to have a procedure for the isolation of polysaccharides from Aloe that would allow the immunomodulatory activity to be retained and stabilized. The present invention provides
10 such methods.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present application relates to methods for activating and isolating a mixture of polysaccharides from Aloe. Included in the present invention is the activated mixture of
15 polysaccharides produced and the use of said mixture as an immunostimulating, immunomodulating and wound healing agent. The activity of polysaccharides isolated by the method of this invention is much higher and much more stable and reproducible than that of native Aloe gel extracts.

The method of the present invention is comprised of (a) extracting Aloe gel juice
20 from Aloe; (b) performing a controlled limited enzymatic hydrolysis of the total polysaccharides in said Aloe gel juice at a temperature and for a period of time suitable for limited carbohydrate hydrolysis; (c) terminating said hydrolysis; and (d) optionally decolorizing and filtering said hydrolyzed product. In a preferred embodiment the limited hydrolysis is performed by the addition of cellulase at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for a period of 2-2.5 hours
25 using a ratio of 0.5 g -2.5 g of cellulase to 216 L of gel extract. A schematic diagram of the instant method is provided in Figure 1.

The present invention includes the mixture of polysaccharides (referred to herein as "Immuno-10" or "Immuno-10 polysaccharide") prepared and isolated by the methods of this invention. Said composition of matter is characterized in detail below.

30 The present invention also includes the use of Immuno-10 as an immunostimulating, immunomodulating and wound healing agent. Immuno-10 prevents suppression of contact

hypersensitivity (CH) in mice exposed to UVB radiation and also inhibits UVB irradiation-induced tumor necrosis factor (TNF- α) release in human epidermoid carcinoma cell line. The Immuno-10 isolated by the method of this invention can be used in an oral or topical formulation for the restoration or stimulation of the human immune system, for individuals
5 suffering immunodeficiency or immune-suppressing diseases or for therapeutic treatment for diseases, such as HIV. The Immuno-10 isolated by the method of this invention is also useful for wound healing. The polysaccharides isolated by the method of this invention are more active and more stable than native Aloe gel.

The methods described herein include a limited and controlled hydrolysis of Aloe
10 polysaccharides, which operates to increase the stability and immunomodulatory activity of Aloe polysaccharides. The method is faster, simpler and more amenable to scale-up than prior art methods, and does not involve the use of organic solvents. Moreover, the processes described herein increase the solubility of Aloe polysaccharide and reduce the viscosity of solutions thereof without loss of the immunomodulatory activity. Immuno-10
15 isolated using the method of this invention shows qualitatively-similar UVB protective activity as the activated bulk polysaccharide purified from the same Aloe gel extracts, but has a higher specific activity than the bulk polysaccharide. Additionally, the purified Immuno-10 exhibits UVB CH restorative activity that is at least twice as high as that of native Aloe gel.

20 It is to be understood that both the foregoing general description and the following detailed description are exemplary and explanatory only and are not restrictive of the invention as claimed.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 Figure 1 illustrates schematically the general method of the present invention for the preparation of Immuno-10 from Aloe.

Figure 2 depicts a chromatogram of Immuno-10, following limited enzyme hydrolysis, decolorization and filtration (Example 1). The chromatography was performed
30 on a on a Sepharose CL-4B column, monitoring absorbance at 490 nm using the phenol sulfuric acid method.

Figure 3 depicts the chromatogram of partially purified Immuno-10 prepared according to the method of Example 3. The chromatography was performed on a Sephadex G-100 column and absorbance at 490 nm was monitored.

5 Figure 4 illustrates the degradation of Aloe polysaccharides by cellulase at 3 minutes (\diamond), 10 minutes (\circ), 30 minutes (Δ), 60 minutes (\blacklozenge), 120 minutes (\blacktriangle), 24 hours (\bullet) and 48 hours (\blacksquare).

10 Figure 5 depicts a chromatogram of Aloe polysaccharide isolated by three different methods: polysaccharide purified from fresh extract using known methods (\blacktriangle), polysaccharide derived from freeze dried Aloe gel (\blacksquare) and polysaccharide derived from Aloe whole leaf (\bullet). The chromatography was performed on a Sepharose CL-4B column, monitoring absorbance at 490 nm.

15 Figure 6 depicts a chromatogram of Immuno-10 on a Sephadex G-100 column after standing three months in H_2O at pH 4.3 (\circ) and pH 7.8 (\bullet) at room temperature.

20 Figure 7 depicts the chromatogram of purified native Aloe polysaccharide on a Sephadex G-100 column after standing three months in H_2O at pH 4.3 (\circ) and pH 7.8 (\bullet) at room temperature.

Figure 8 illustrates graphically the ability of Immuno10 to restore skin immune function (contact hypersensitivity UVB assay).

25 Figure 9 illustrates graphically the inhibition of UVB irradiation-induced tumor necrosis factor- α (TNF- α) release by Immuno-10.

Figure 10 illustrates graphically the stimulation of TNF- α release from mouse peritoneal macrophages by Immuno-10.

30

Figure 11 illustrates graphically the stimulation of cell proliferation by Immuno-10.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present application is drawn to methods for activating and isolating a defined biologically active mixture of polysaccharides from Aloe. The term "Aloe" refers to the genus of plants found worldwide from the Liliaceae family of which the *Aloe barbadensis* plant is a species. The method of the present invention is comprised of (a) extracting Aloe gel juice from Aloe; (b) performing a limited and controlled hydrolysis of the total polysaccharides in said Aloe gel juice at a temperature and for a period of time suitable for limited carbohydrate hydrolysis; (c) terminating said hydrolysis; and (d) optionally decolorizing and filtering said hydrolyzed product.

A schematic diagram of the instant method is provided in Figure 1. With reference to Figure 1, Aloe gel juice (AGJ) is produced from fresh gel fillets by any method known in the art, including but not limited to grinding, using a "Thompson Aloe Juice Extractor" (Thompson Manufacturing Co., Harlingen, Texas) or using pressure rollers. The AGJ is then mixed with a hydrolyzing agent. Examples of hydrolyzing agents include but are not limited to enzymes, such as cellulase, pectinase or mannanase and non-enzymatic hydrolyzing agents, such as hydrochloric acid and trifluoroacetic acid. In a preferred embodiment the hydrolyzing agent is an enzyme. Most preferably the hydrolyzing agent is a cellulase, such as cellulase 4000 (Valley Research Inc.). The resulting mixture is allowed to incubate at a temperature and for a length of time suitable for limited carbohydrate hydrolysis (see Example 1). For example when the hydrolyzing agent is cellulase this is preferably 2-2.5 hours at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ using a ratio of 0.5 g to 2.5 g of cellulase to 216 L of gel extract (see Example 4).

Carbohydrate hydrolysis is then stopped after the appropriate period of time. If a cellulase is used, this is accomplished preferably by heating the digestion mixture to a high temperature. The resulting Immuno-10 has a red color at this stage, and this color may optionally be removed by mixing the Immuno-10 with charcoal particles to form a slurry (see Example 1) or by column chromatography. Examples of suitable chromatography resins, including but not limited to reverse-phase resins. Examples of reverse phase resins, include but are not limited to aromatic resins, such as the XAD series of resins and CG-161 and non-aromatic resins, such as C-4, C-8 and C-18. In preferred embodiments, such Immuno-10 slurry is filtered in order to remove the charcoal particles. This can be

accomplished by any of the methods known in the art. Preferred embodiments of the invention use a multistep filtration scheme, in which the slurry is passed through a series of filters of progressively smaller pore sizes (see Example 1 and Tables 1 and 2). For example, in some embodiments, the slurry is filtered over 30 μm filter paper, then over 1.0 μm filter paper, and finally over 0.7 μm filter paper. In some embodiments, a filtration aid, such as a celite, FW12 or Fw14 is included in the mixture to be filtered. Following filtration using this method, the filtrate is decolorized and free of fine charcoal particles.

Following the optional decolorization and filtration, the Immuno-10 may be dried for storage by lyophilization or spray-drying. Typical yields using the instant method are approximately 6 g of lyophilized solids per liter of AGJ. Chromatography of Immuno-10 on a Sepharose CL-4B column reveals that it contains both polysaccharide and monosaccharide fractions as evidenced by the presence of two carbohydrate peaks at 490 nm (Figure 2). Although the immune regulating activity is contained within the polysaccharide peak, the monosaccharides do not affect this activity (data not shown). The monosaccharides can be removed by diafiltration/dialysis of AGJ prior to the limited enzymatic digestion.

Examples 2 and 3 describe methods for the preparation of pharmaceutical grade Immuno-10, which is a purer form of Immuno-10 having greater biological activity and stability.

Included in the present invention is the activated polysaccharide (referred to herein as "Immuno-10" or "Immuno-10 polysaccharide"), produced by the methods of the invention.

The composition and chemical structure of the activated polysaccharides in Immuno-10 was determined using pharmaceutical grade Immuno-10 having a purity of > 95% and is as follows:

Size exclusion chromatography analysis shows that the average molecular weight of the polysaccharides in Immuno-10 is 70~80 kDa with a range between 50~200 kDa. The molecular weight was determined using size exclusion chromatography on a Sephadex G-100 column and HPLC gel permeation on a Superose 12 column (H10/30 Pharmacia).

Analysis of the monosaccharide composition indicates that the polysaccharides in Immuno-10 contain D-galactose (approx 5% or less), D-glucose (approx. 5% or less) and

D-mannose (approximately 90%). The polysaccharides in Immuno-10 may also contain trace amounts of xylose and arabinose.

Pharmaceutical grade Immuno-10, which is more highly purified (see Examples 2 and 3), contains mainly D-galactose and D-mannose in a ratio of 1 to 9.6 \pm 2.2.

5 Proton and ^{13}C NMR-spectroscopy analysis indicates that the monosaccharide linkages are primarily β -1,4 linkages. The proton and ^{13}C -NMR spectra were analyzed on a Varian XL-300 spectrometer. The main structure of Immuno-10 polysaccharide is β -1,4 glucomannan. Furthermore, the polysaccharide is highly acetylated (approximately 1 acetyl group per sugar residue on average). The 2, 3 and 6 positions of the monosaccharide units
10 can be independently substituted with an -OH or an -OAc.

Chromatography of Immuno-10 reveals that it contains both polysaccharide and monosaccharide fractions (see Figure 2). The monosaccharide composition of the activated polysaccharide was determined by high performance anion-exchange chromatography on a Dionex CarboPac PA1 column with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) using a
15 Dionex Bio-Lc system. Although the immune regulating activity is contained within the polysaccharide peak, the monosaccharides do not affect this activity (data not shown). Immuno-10 may also contain various salts which also do not affect its activity.

Immuno-10 is stable to heat and protease treatments without losing its biological activity, which further indicates that the biological activity of Immuno-10 can be attributed
20 to the activated polysaccharide.

The Immuno-10 isolated by the method of this invention has greater stability than Aloe polysaccharides isolated using previously known methods. Examples 5 and 6 (Figure 5-8) illustrate the relationship between the method of processing the polysaccharide and its stability.

25 This invention also includes the use of Immuno-10 as an immunostimulating, immunomodulating and wound healing agent.

Immunomodulating activity. Immuno-10 restores the UVB-suppressed immune response (contact hypersensitivity); and inhibits UVB-induced Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) release from keratinocytes (Human epidermoid carcinoma cells, KB cells).

30 The local suppression model was used to determine the ability of Immuno-10 to reverse the UVB-suppressed skin immune function, referred to herein as the restorative

activity of Immuno-10, as set forth schematically in Example 7. (See, Strickland (1994) J. Invest. Dermatol. 102:197-204 and Vincek *et al.* (1994) Cancer Research 53:728, which are incorporated herein by reference). In the local suppression model, C3H/HeN mice are exposed to low doses of UVB radiation, which inhibits the induction of the contact hypersensitivity (CH) response to haptens applied at the site of the irradiation. Briefly, the abdominal fur of the mice was shaved and exposed to UVB irradiation at 2000 J/m², after which Immuno-10 (0.25 mg/mL) in Aquaphor, a known vehicle, was applied to the irradiated area. Three days later the mice were sensitized on the site of irradiation by application of 2,4-dinitrobenzene (DNFB) (0.3%, 50 µL). Six days later the thickness of their ears was measured and then the mice were challenged by application of DNFB (0.2%, 5 µL) to both sides of their ears. Twenty-four hours later the thickness of their ears was measured again. The results are set forth in Figure 8.

In most of the experiments performed, UVB exposure inhibited the CH response by 80~100%. With reference to Figure 8, this group was used as the negative (suppressed) control (0% CH response). The positive control group of mice received no UVB irradiation and no treatment with Immuno-10 (vehicle only), but were sensitized and challenged (100% CH response). The vehicle (blank) control group of mice received no UVB irradiation, no treatment with Immuno-10 (vehicle only) and no sensitization, but were challenged. This group was used to subtract the net ear swelling caused by any challenge chemical irritation. The Immuno-10 treated groups of mice were treated in the same way as the suppressed control, except that the mice were treated with Immuno-10 in vehicle instead of vehicle only. The percentage of recovery by Immuno-10 was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100$$

wherein

A = Net ear swelling of Immuno-10 treated group - Net ear swelling of Blank group;

B = Net ear swelling of the Suppressed group - Net ear swelling of the Blank group; and

C = Net ear swelling of the Positive group - Net ear swelling of the Blank group.

The higher the percentage of recovery, the more active the Immuno-10. As can be seen in Figure 8, the activity of Immuno-10 is between 30~80% with an average of about 60%.

The immunomodulating activity was stable when Immuno-10 was stored in a solution at 4°C for 3 months or in a solid form at room temperature for one year.

It has been reported that UVB-induced TNF- α release is involved in the mediation of local immune suppression within the epidermis. An *in vitro* model was developed to determine the suppression of UVB-induced TNF- α release by Immuno-10. This method is described in Example 8. Human epidermoid carcinoma cell line (KB cells) were used (normal cells do not produce enough TNF- α to be measurable by ELISA). The results are set forth in Figure 9. The X-axis in Figure 9 represents the dose of Immuno-10 (mg/mL final concentration in cell media). The Y-axis shows the percentage of inhibition by Immuno-10. The percentage of inhibition by Immuno-10 was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100$$

15

A = TNF- α amount in the media from the UVB - irradiated and Immuno-10 treated cells;
B = TNF- α amount in the media from the cells without UVB - irradiation; and
C = TNF- α amount in the media from the UVB - irradiated cells, but without Immuno-10 treatment.

As can be seen in Figure 9, Immuno-10 showed a dose-dependent inhibition of UVB-induced TNF- α release from KB cells. At the concentration of 1 mg/mL, Immuno-10 inhibited the release by almost 100%.

Immunostimulating activity. Immuno-10 activates macrophages by stimulating TNF- α release.

Host defense against malignant tumors consists of several different mechanisms and impairment or failure of immunological defense may lead to the development or progression of malignant disease. Macrophages are antigen-processing cells and have been demonstrated to be both cytotoxic and phagocytic. Each of these functions are significantly enhanced when macrophages are activated. Selective stimulation of this cell population could be important in contributing to the development of therapeutic applications. Activated macrophages are also crucial in the body's ability to heal wounds. Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), one of the cytokines released by macrophages, plays a critical

- role in mediating the signal transduction of the defense system. Example 9 describes the method used to determine Immuno-10 stimulated macrophage activation. The results are set forth in Figure 10. As shown in Figure 10, a dose-dependent stimulation of TNF- α release from mouse peritoneal macrophages by Immuno-10 was detected. At the
- 5 concentration of 0.5 μ g Immuno-10 per mL, Immuno-10-stimulated macrophages released 500 times more TNF- α than the unstimulated cells. As can also be seen in Figure 10, under the same experimental conditions, native Aloe gel did not induce TNF- α release from macrophages. This result indicates that Immuno-10 can be used as both a non-specific stimulator of the immune system and for wound healing.
- 10 **Wound healing activity.** Immuno-10 stimulates fibroblast proliferation (baby hamster kidney cells, BHK-21 cells).

Example 10 describes the method used to determine Immuno-10 cell proliferation. The MTT method was used to determine the stimulated cell proliferation. The results are set forth in Figure 11. As can be seen in Figure 11, Immuno-10 stimulates BHK-21 cell

15 growth in a dose-dependent manner.

The following examples are provided for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

20 Example 1. Isolation and Purification of Immuno-10

Immuno-10 was isolated and purified as outlined in Figure 1. Briefly, fresh *Aloe barbadensis* gel extract was subjected to limited enzyme digestion at a temperature and for a length of time suitable for limited carbohydrate hydrolysis. This is typically 2 hours at 25°C, using cellulase as the enzyme. The activated Aloe gel was partially purified using

25 activated carbon and filtration (I-10). The activated polysaccharide was then further purified by dialysis, ethanol precipitation and size exclusion chromatography.

Limited Enzyme Digestion

Aloe Gel Juice (AGJ) (10 L) produced from fresh gel fillets (provided by Aloecorp (Harlingen, TX)) was heated to 25°C with a heat exchanger consisting of 60°C water

30 circulating through a 1/4" 316 stainless steel coil while gently mixing with a mechanical agitator equipped with a marine propeller blade (A100). A solution of 116 mg of cellulase

4000 (Valley Research Inc.) in 10 mL of 50 mM aqueous citrate at pH = 6 was added and the mixture was gently stirred for 2 hours.

Enzyme Deactivation

After two hours, the reaction mixture was heated to about 90°C for a minimum of 5 30 minutes. The reaction mixture was then immersed in an ice-water bath to cool the material to room temperature.

Decolorization and Filtration

Charcoal was used to remove the red color developed during the enzyme deactivation. The material was divided into two 5.0 L batches. To each of the 5.0 L 10 batches, 100.0 g of coarse charcoal (Darco 20 x 40, purchased from Norit) was added and the mixture gently stirred for one hour at room temperature. Subsequently, 50.0 g of celite 545 (Aldrich Chemical Co.) was added and the slurry stirred for an additional 10 minutes.

The slurry was then pumped into a pressure filter equipped with a 30 µm filter paper (Whatman Grade 113) to remove the solids. The filtrate contained a small amount of fine 15 charcoal particles that channeled through the filter. The material was clarified when filtered over two superimposed filters, a 1.0 µm pore size filter paper (Whatman # 1) on top of 0.7 µm filter paper (Whatman GF/F) that were coated with 100 g of celite 545. The filtrate was decolorized and free of fine charcoal particles. The activated polysaccharide was further purified by dialysis, ethanol precipitation and size exclusion chromatography. The filtration 20 data is summarized forth in Tables 1 and 2.

Table 1. First Filtration

Parameter	Value
Volume of Slurry	5 L
Filter paper	Whatman # 113
Pore Size	30 µm
Filter Aid	None
Filtration Area	113 cm ²
Maximum Pressure	< 1 psi
Average Filtration Rate	7.0 mL/min/cm ²
Liquid Recovery	Quantitative
Material Appearance	Contained fine charcoal Particles

Table 2. Second Filtration

Parameter	Value
Volume of Slurry	5 L
Filter paper (combination)	Whatman # 1 on top of Whatman GF/F
Pore Size	1.0 μm on top of 0.7 μm
Filter Aid	100 g of Celite 545
Filtration Area	113 cm^2
Maximum Pressure	2 psi
Average Filtration Rate	0.74 $\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$
Liquid Recovery	Quantitative
Material Appearance	Clear

Lyophilization

Following filtration the two batches were combined and the material was transferred into lyophilization trays, frozen and lyophilized in a 20 L VirTis Freeze Dryer, to yield 57.14 g of Immuno-10, which is equivalent to 5.71 g of Immuno-10 per liter of AGJ.

Example 2. Preparation of Pharmaceutical Grade Immuno-10 using a Hollow-Fiber

20 Cartridge

Ten grams of freeze-dried Aloe gel was dissolved in 1.8 L of distilled water in a 2 L beaker. The slurry was stirred overnight at 4°C producing a homogenous mixture. The mixture was filtered through filter paper (Whatman #3) to remove any particulates and the volume of the filtrate was adjusted to 2 L. The mixture was brought to room temperature and a solution of 4.63 mg of cellulase 4000 (Valley Research Inc.) in 5 mL of 50 mM aqueous citrate at pH 6 was added. The filtrate was then pumped through a Hollow-fiber cartridge (UFP-5-E-6, molecular weight cutoff: 5000 Da, A/G Technology Corporation) at an inlet pressure between 10 to 15 psi. Permeate, which had a molecular weight of less than 5,000 Da, was collected in a separate 2 L beaker. The concentrate, which had a molecular weight of greater than 5,000 Da, was collected in the same beaker as the starting filtrate. This mixture was continuously stirred and when the volume of starting filtrate was reduced to one liter, distilled water (1L) was added to bring the volume back to 2 L. This procedure was repeated 5 times. A total of three 2 L fractions of permeate were collected. The final concentrate was collected as the retained fraction. It took an average of approximately 2.5 hours to collect each 2 L permeate fraction. The fractions were transferred into

lyophilization traps, frozen and lyophilized in a 20 L VirTis Freeze Dryer. The yields of the permeate fractions I, II and III, and the retained fraction were 4.88 g, 1.77 g, 0.56 g and 0.37 g, respectively. The retained fraction had the highest activity to restore UVB-suppressed contact hypersensitivity. Fraction III of the permeates had moderate activity to restore
5 UVB-suppressed contact hypersensitivity. Fractions I and II of the permeates were inactive.

Example 3. Process for Preparation of Pharmaceutical Grade Immuno-10

Immuno-10 (50 g), prepared by the method described in Example 1, was dissolved in distilled water (diH_2O) to a final volume of 200 mL. Ethanol (66.7 mL, 25% final
10 concentration) was then added to this solution. The addition of ethanol was done slowly while stirring. The solution was then stirred for an additional 30 minutes, during which time a precipitate formed. The mixture was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes (Jouan CR412), and the precipitate was washed once with 25% ethanol, centrifuged and resolubilized in diH_2O . The resulting solution was lyophilized to dryness (ppt/25%). An
15 additional 133.3 mL of ethanol (25%~50%) was added to the supernatant, as described above, the solution was again stirred for 30 minutes, and the precipitate was collected, washed with 50% ethanol and lyophilized (ppt/25%-50%). This procedure was repeated two more times recrystallizing with 50-75% ethanol (ppt/50%-75%) and 75-80% ethanol (ppt/75%-80%). The solid recoveries of the precipitate for ppt/25%, ppt/25-50%, ppt/50-
20 75% and ppt/75-80% were 0.3%, 20.5%, 10.3% and 1.5%, respectively. The product of ppt/50-75% was further fractionated on a Sephadex G-100 column (2.5 x 68 cm). The fractions of the polysaccharide peak (left peak, Figure 3) were combined and lyophilized, to produce pharmaceutical grade Immuno-10. The recovery of the pharmaceutical grade Immuno-10 from the ppt/50-75% was 15.8%.

25

Example 4. Time Dependant Degradation of Aloe Vera Gel (AJG) Polysaccharide

Fresh Aloe vera gel extract was treated with cellulase (11.57 mg cellulase per liter of gel extract) at room temperature for 3 minutes, 10 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 120 minutes, 24 hours and 48 hours. At the end of the treatment, the gel extracts were heated at
30 95°C in a water bath for 30 minutes followed by centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes. The supernatants were lyophilized to dryness. The molecular weight distribution of

polysaccharides in the treated gel extracts was analyzed by size exclusion chromatography on a Sephadex G-75 column (2.5 x 68 cm, 177-179 mg of sample was applied to the column). Polysaccharides having a molecular weight $\geq 75,000$ Da eluted at the void volume, while monosaccharides and some oligosaccharides eluted at the column volume (see Figure 4). The preferred hydrolysis reaction time, based upon biological activity of the resultant product, was determined to be 120 minutes. As can be seen in Figure 4, treatment with cellulase for 120 minutes resulted in a sharp polysaccharide peak having no shoulder (\blacktriangle). Treatment with cellulase for 24 hours (\bullet) or 48 hours (\blacksquare), resulted in a significant decrease in the absorbance of the polysaccharide peak, while the absorbance of the monosaccharide and oligosaccharide peak was increased. The product obtained by treatment for 3 minutes (\diamond), 10 minutes (\circ) and 30 minutes (\triangle) resulted in a polysaccharide peak having a shoulder.

Example 5. Stability of Aloe Polysaccharide in Different Aloe Preparations

The stability of polysaccharide in fresh Aloe gel extract (purified using standard methods of purification, *i.e.*, dialysis and ethanol precipitation), freeze-dried Aloe gel and freeze-dried Aloe whole leaf was studied by size exclusion chromatography on Sepharose CL-4B column (see Figure 5). As can be seen in Figure 5, the Aloe polysaccharide isolated from the fresh Aloe gel extract has a molecular weight of ~ 2 million Da. The polysaccharide in the freeze-dried Aloe whole leaf has a lower molecular weight than that of the polysaccharide isolated from the fresh Aloe gel extract and the polysaccharide in the freeze-dried Aloe gel has a molecular weight of $\sim 500,000$ Da. This result demonstrates the relationship between the method of processing the polysaccharide and the stability of the Aloe polysaccharide.

Example 6. Stability of Immuno-10 Polysaccharide

Immuno-10 contains some salts and other small molecules besides polysaccharide. The pH of Immuno-10 in distilled water (diH_2O) is about 4.3. To study the stability of Immuno-10 polysaccharide, both purified native Aloe polysaccharide and solutions of Immuno-10 at pH 4.3 or pH 7.8 were left at room temperature for three months. Sodium azide at a final concentration of 0.02% was added to the Immuno-10 or polysaccharide

solutions to inhibit microbial growth. The degradation of polysaccharide in these samples was analyzed on Sephadex G-100 column. Figure 6 depicts the chromatogram showing that the polysaccharide absorbance of Immuno-10 at 490 nm was very similar at both pH 4.3 and pH 7.8. Although the polysaccharide peak shifted slightly to the right side at pH 4.3, it was still very stable under both pH conditions compared with the starting material. Under the same condition, the purified native polysaccharide was partially degraded at pH 7.8 (Figure 7). The slight shift of the polysaccharide peak could be due to repacking of the Sephadex G-100 column.

10 Example 7. Determination of Immuno-10 Restored UVB-Suppressed Contact Hypersensitivity

Specific-pathogen-free female C3H/HeN mice were obtained from Harlan Sprague Dawley and maintained in a pathogen-free facility in accordance with National Research Council of Laboratory Animal Care guidelines. Each experiment was performed with age-matched mice 9-10 weeks old.

The abdominal hair of mice was removed with electric clippers. The mice having had their ears covered with aluminum foil were then exposed to a bank of four unfiltered FS40 sunlamps (National Biological Corp.) at a dose of 2000 J/m². Approximately 65% of the energy emitted from these lamps was within the UVB range (280-320) and the peak emission was 313 nm. Immediately after the UVB exposure, Aquaphor (vehicle) alone or tested compound in Aquaphor at a 1:1 ratio was applied onto the abdominal skin of the mice. The mice were then sensitized on their shaved abdominal skin with 50 µL of 0.3% dinitrofluorobenzene (DNFB), 3 days after the UVB exposure. Six days after sensitization, the mice were challenged by painting 5 µL of 0.2% DNFB on both the dorsal and ventral surface of each ear. Ear thickness was measured using an engineers' micrometer immediately before challenge and 24 hours later. Specific ear swelling was determined by subtracting values obtained from mice that were challenged but not sensitized (blank group). Each treatment group contained five mice. Two additional control groups were included in each experiment --a positive control group and a suppressed group. The positive control received no UVB radiation and no treatment, but sensitized and challenged

(100% response). The suppressed group of mice received UVB radiation and no treatment, but were sensitized and challenged (0% response). The results are set forth in Figure 8.

Example 8. Determination of Immuno-10 Suppressed UVB-induced TNF- α release

- 5 Human epidermoid carcinoma cells (KB) were plated at 2×10^6 cells per 100 mm dish. After the cells reached confluence (about 2 days), they were washed three times with PBS and exposed to UVB radiation at 300 J/m². The cells were then washed once with PBS and incubated in 5 mL DMEM/0.2% FBS with or without Immuno-10 for 1 hour. The cells were washed once more with PBS and further incubated in a growth medium overnight.
- 10 The next day the medium was collected and centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes at 4°C. The TNF- α released into the supernatant was determined by ELISA. The results are set forth in Figure 9.

Example 9. Determination of Immuno-10 Stimulated Macrophage Activation

- 15 Resident mouse peritoneal macrophages were isolated from ICR mice and plated at 200,000 cells per well in a 96-well plate. The cells were washed three times to remove non-adherent cells after a 2 hour incubation. Macrophages were then incubated with or without Immuno-10 overnight. The TNF- α released into the media was determined by ELISA. Lipopolysaccharides (LPS) were used as a positive control. The results are set forth in
- 20 Figure 10.

Example 10. Determination of Immuno-10 Stimulated Cell Proliferation (MTT)

- Baby hamster kidney cell line (BHK cells) were plated at 5000 cells per well in a 96-well plate. The cells were incubated with or without Immuno-10 for 3 days in the tissue
- 25 culture incubator. The cells were then incubated with 1 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue) for 4.5 hours. The absorbance at 570-630 nm was determined after the cells were extracted with 100 μ L of 10% SD in 0.01N HCl. Fibroblast growth factor (FGF) was included as a positive control. The results are set forth in Figure 11.

What is claimed is:

1. A method for the isolation of immunomodulatory carbohydrate from Aloe species, comprising:
 - (a) extracting Aloe gel juice from said Aloe species;
 - 5 (b) performing a controlled limited hydrolysis of total polysaccharide in said Aloe gel juice;
 - (c) terminating said controlled limited hydrolysis; and
 - (c) optionally decolorizing and filtering said Aloe gel juice.
- 10 2. The method of claim 1 wherein step (b) is accomplished by treating said Aloe gel juice with an enzymatic or chemical hydrolyzing agent.
3. The method of claim 2 wherein said enzyme is selected from the group consisting of cellulase, pectinase or mannanase.
- 15 4. The method of claim 2 wherein said enzymatic hydrolyzing agent is cellulase, added at a ratio of 0.5 g - 2.5 g of cellulase to 216 L of aloe gel juice.
5. The method of claim 4 wherein step (b) is performed at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 2 -
20 2.5 hours.
6. The method of claim 1 wherein step (b) is performed at a temperature and for a period of time in which to maximize biological activity.
- 25 7. The method of claim 1 wherein said hydrolysis is terminated by heating or by neutralization.
8. The method of claim 5 wherein said hydrolysis is terminated by heating to $85-90^{\circ}\text{C}$ for 30-50 minutes.

9. The method of claim 1 wherein step (d) is accomplished by adding charcoal to said Aloe gel juice and then passing said Aloe gel juice through a series of filters with progressively smaller pore sizes.

5 10. The method of claim 9 wherein said series of filters comprises a 30 μm filter, a 1 μm filter and a 0.7 μm filter.

11. The method of claim 9 further comprising the addition of a diatomaceous earth material selected from the group consisting of celite, FW12, or FW14 as a filtration
10 aid to said Aloe gel juice in step (c).

12. A composition of matter prepared according to the method of claim 1.

13. A composition of matter comprised primarily of polysaccharides derived
15 from Aloe having the following characteristics:

(a) said polysaccharides in said composition have an average molecular weight of 70~80 kDa with a range between 50~200 kDa;

(b) said polysaccharides in said composition are comprised of D-galactose (approx. 5% or less), D-glucose (approx. 5% or less) and D-mannose (approximately 90%);

20 (c) said polysaccharides in said composition are comprised of monosaccharides having primarily β -1,4 linkages; and

(d) said polysaccharides in said composition are highly acetylated having approximately 1 acetyl group per monosaccharide, wherein said acetyl group is on the 2, 3 or 6 position of the monosaccharide unit.

25

14. The composition of matter of claim 13 wherein said polysaccharides are also comprised of trace amounts of xylose and arabinose.

15. The composition of claim 13 wherein said polysaccharides are comprised of
30 mainly D-galactose and D-mannose in a ratio of 1 to 9.6 \pm 2.2.

16. The use of the composition of claim 1 as an immunostimulating, immunomodulating or wound healing agent.

17. A method of treating immunodeficiency or immune-suppressing diseases by
5 administering to a person in need thereof the composition of matter prepared by the method of claim 1.

18. The use of the composition of claim 13 as an immunostimulating, immunomodulating or wound healing agent.

10

19. A method of treating immunodeficiency or immune-suppressing diseases by administering to a person in need thereof the composition of matter of claim 13.

1/8

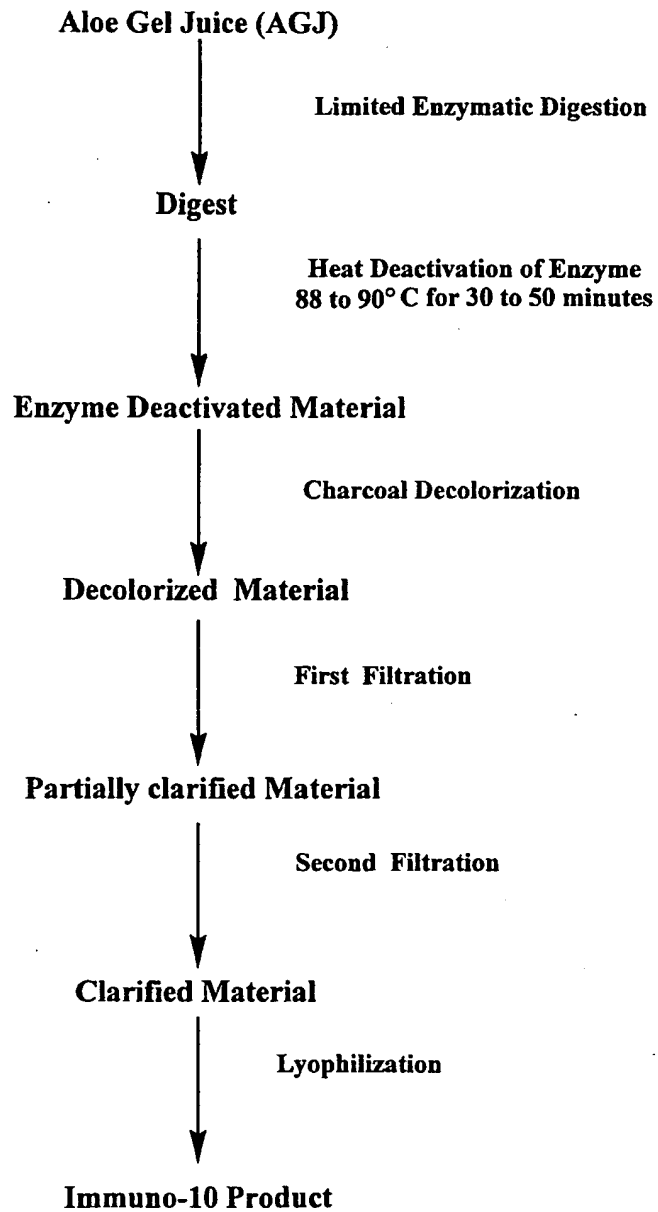


Fig. 1

2/8

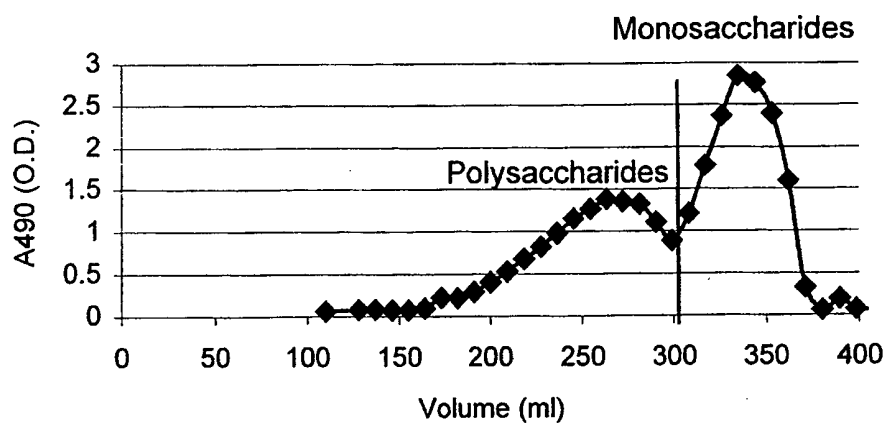


Fig. 2

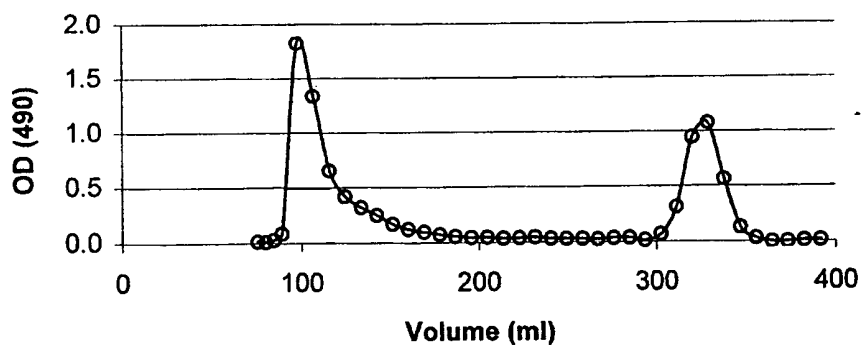


Fig. 3

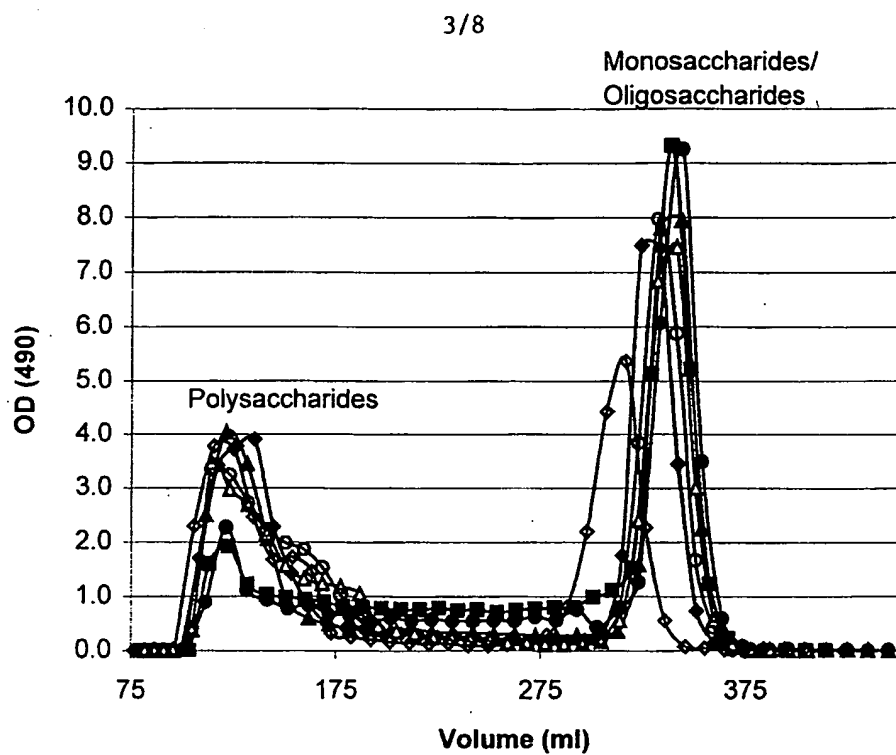


Fig. 4

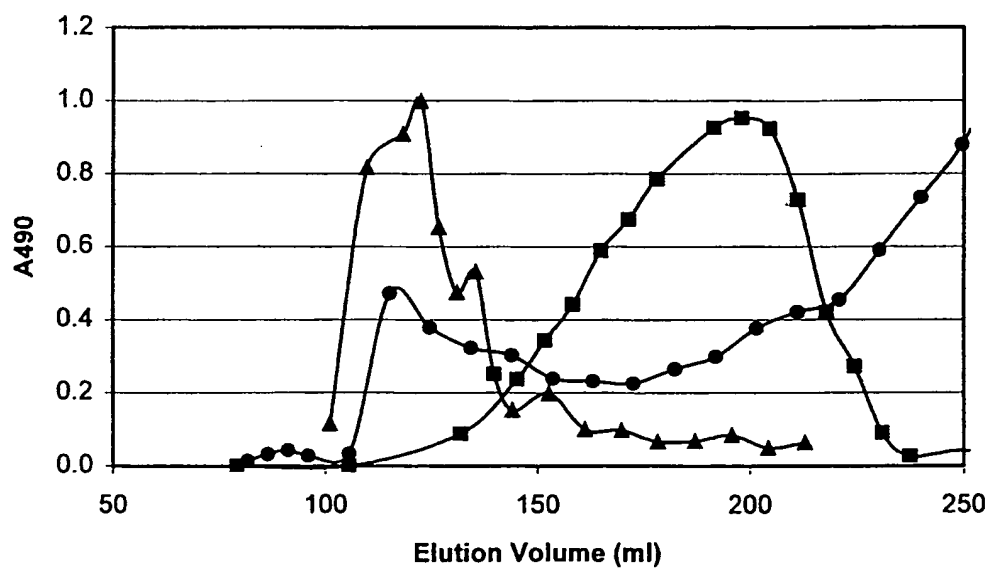


Fig. 5

4/8

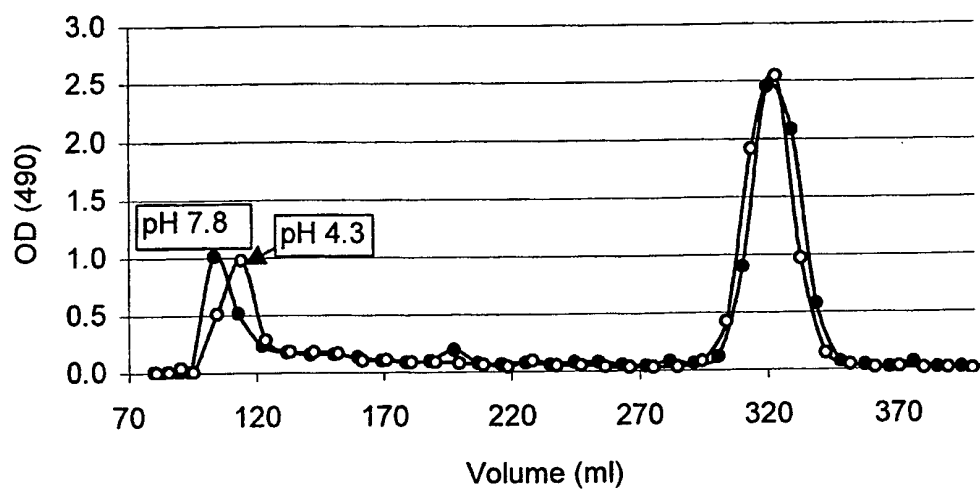


Fig. 6

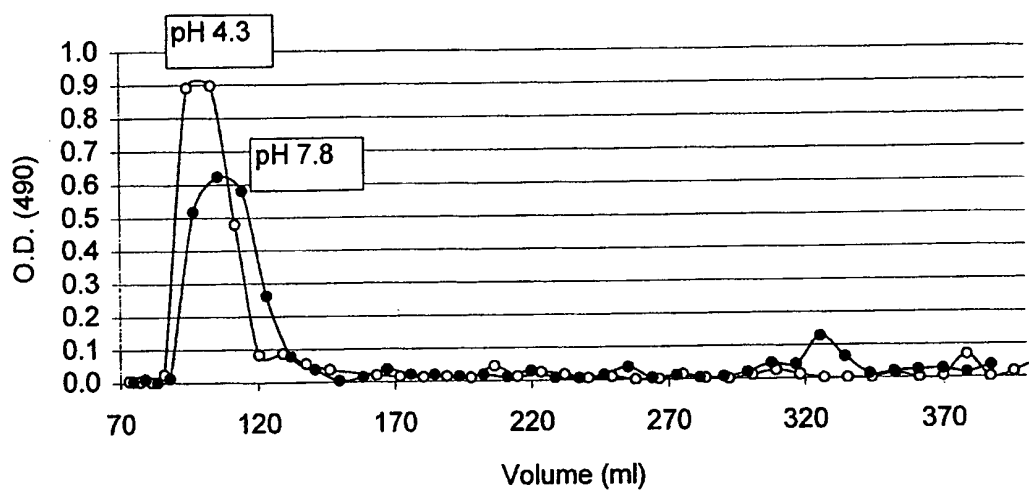
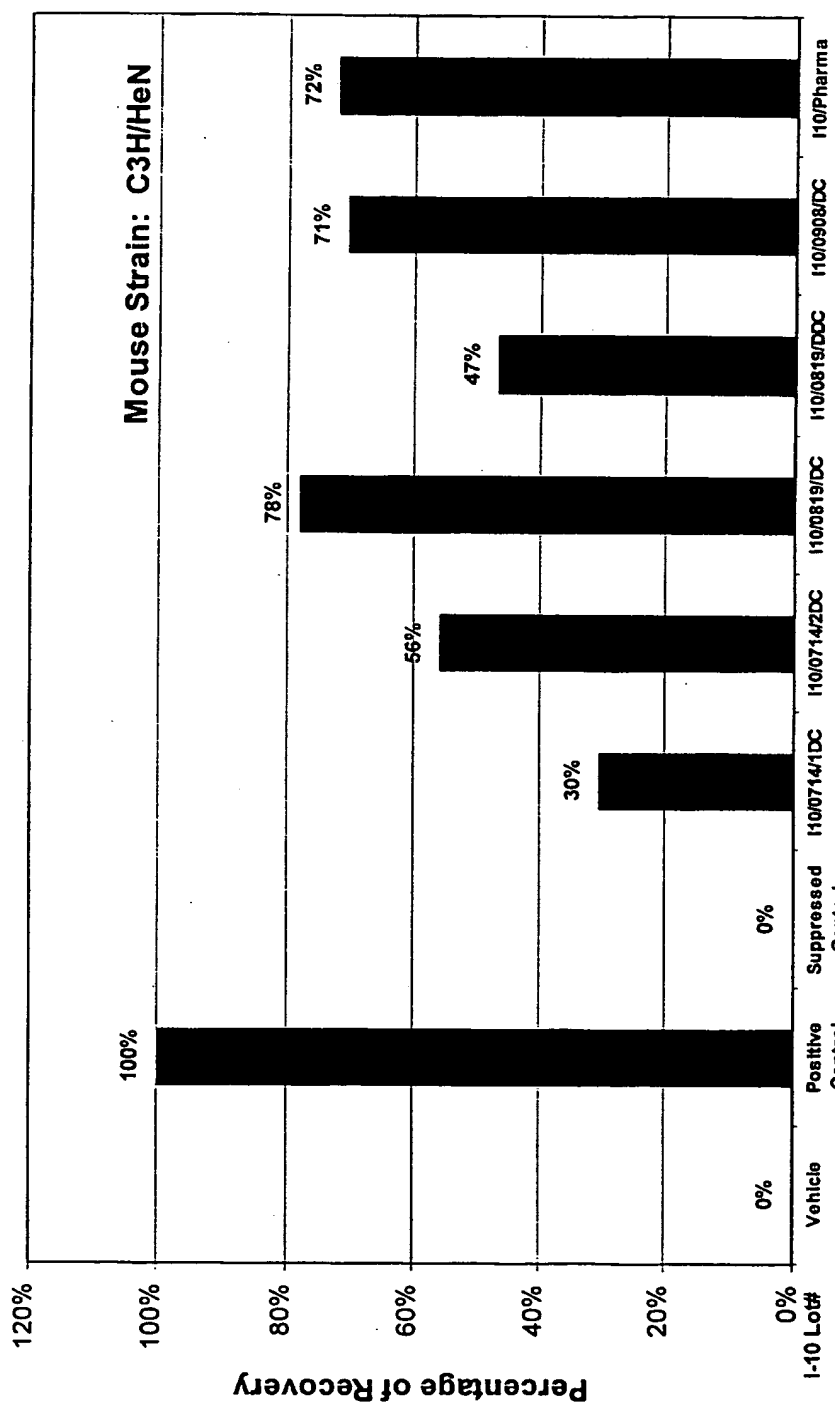


Fig. 7



I10: 2.5mg/ml
 I10/Pharma: 0.5mg/ml
 (pharmacological grade I10)
 Number mice/treatment group = 5

Fig. 8

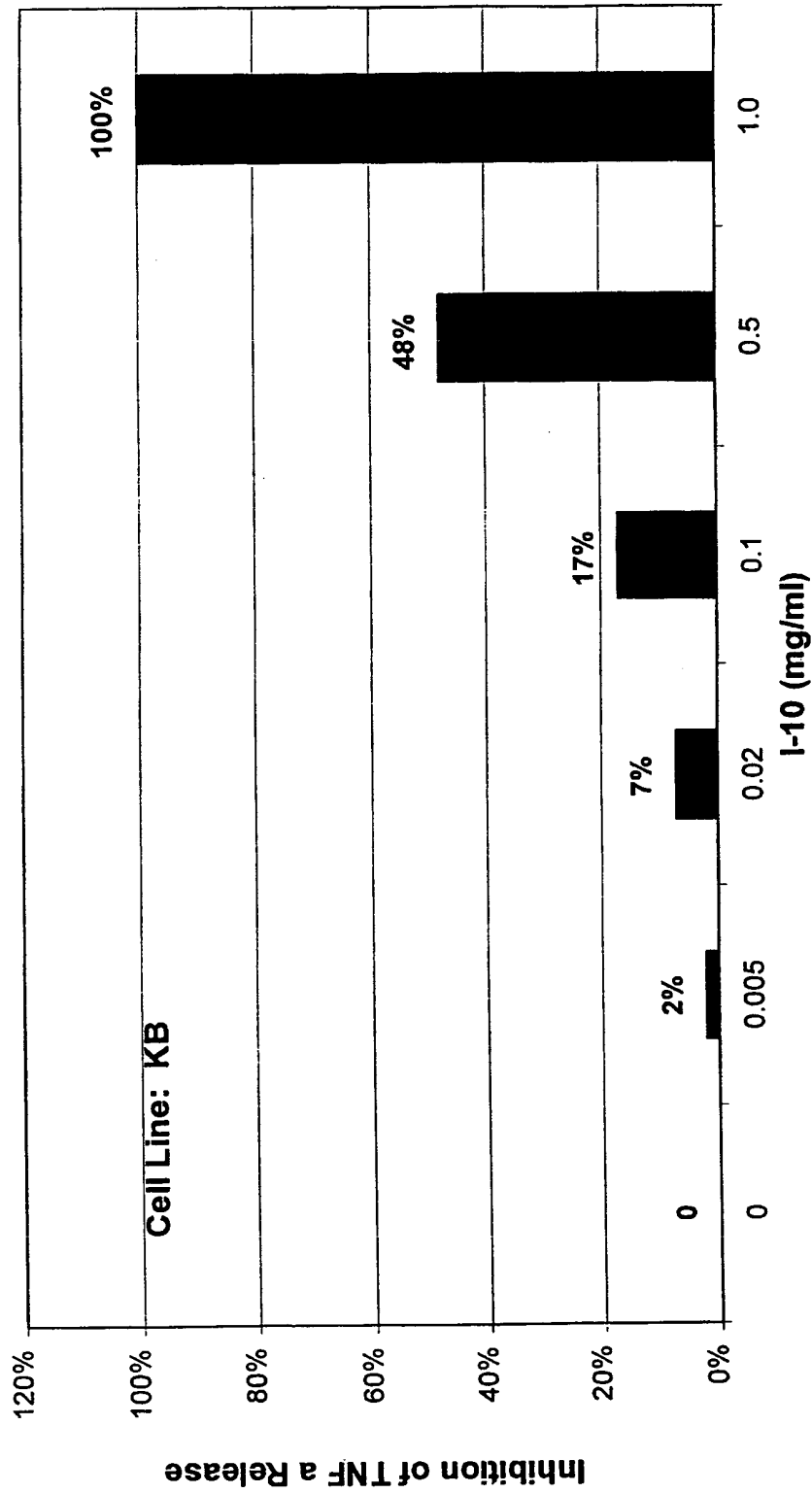


Fig. 9

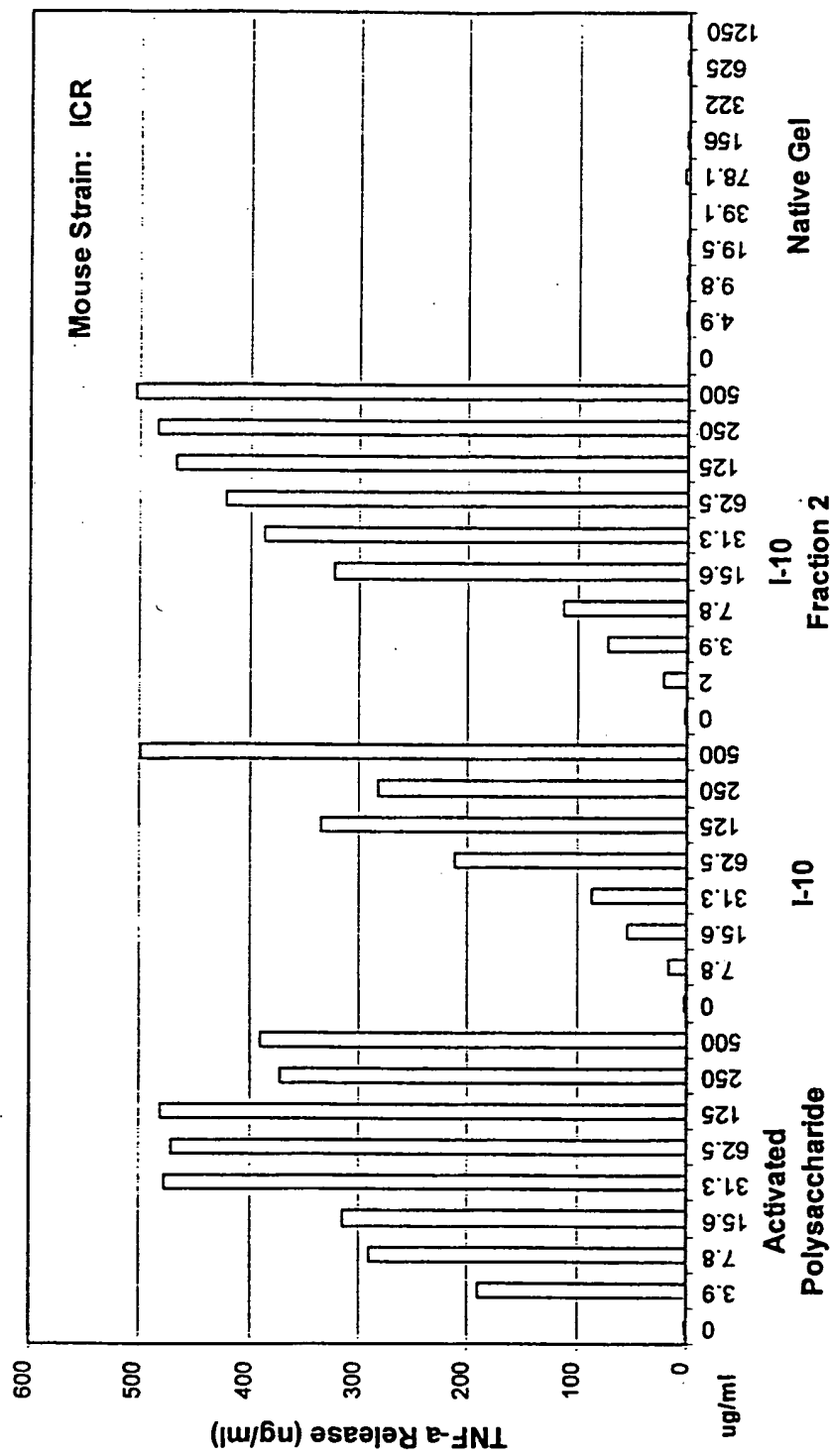
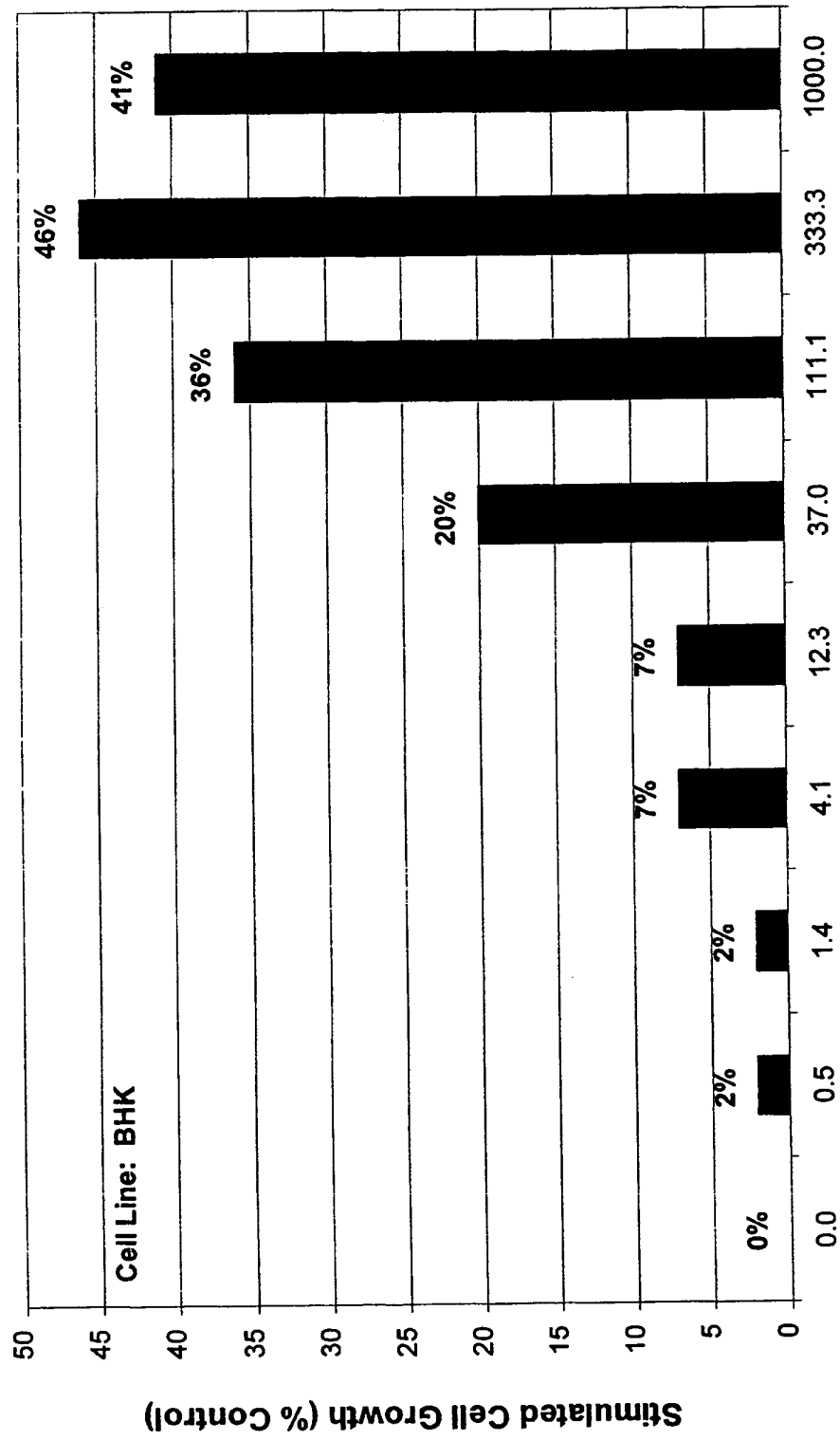


Fig. 10



I-10 (ug/ml)
Fig. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/21361**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(6) : C12P 19/14, 19/04; A61K 31/715; C08B 37/00

US CL : 435/99, 101, 274; 514/54; 536/123, 123.1, 128

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/99, 101, 274; 514/54; 536/123, 123.1, 128

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS ONLINE, BIOSIS, WPIDS

search terms: aloe, polysaccharide, pectinase, pectin esterase, mannanase, cellulase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,735,935 A (MCANALLEY et al.) 05 April 1988, see the whole document, especially columns 37, 38, 65 and 66.	1-19
Y	US 5,441,943 A (MCANALLEY et al) 15 August 1995, col. 8, lines 40-49.	1-12
X, P	Chem. Abstr. Vol. 128, No. 19, 11 May 1998, page 974, column 1, the abstract No. 235122s, STRICKLAND, FAITH M. et al, 'Cytoprotective oligosaccharide from aloe preventing damage to the skin immune system by UV irradiation.' PCT Int. Appl. WO 98/09635, see the whole document.	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

04 DECEMBER 1998

Date of mailing of the international search report

11 JAN 1999

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
FRANCISCO C. PRATS

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/21361

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chem. Abstr. Vol. 126, No. 15, 14 April 1997, page 328, col. 2, the abstract No. 197428v, SHIMIZU, YOSHINORI et al, 'Promotion of pea stem elongation by the fragments of plant cell wall oligosaccharides.' Mokuzai Gakkaishi 1997 43(2), 121-127 (Eng), see the whole document.	1-12
X	Chem. Abstr. Vol. 83, No. 11, 15 September 1975, page 313, column 1, the abstract No. 93833a, OVODOVA, R.G. et al, 'Polysaccharides of Aloe arborescens.' Khim. Priir. Soedin. 1975 11(1), 3-5 (Russ), see the whole document.	1-12



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12P 19/14, 19/04, A61K 31/715, C08B 37/00	A1	(11) International Publication Number: WO 99/19505 (43) International Publication Date: 22 April 1999 (22.04.99)
(21) International Application Number: PCT/US98/21361 (22) International Filing Date: 9 October 1998 (09.10.98) (30) Priority Data: 60/061,681 10 October 1997 (10.10.97) US 60/098,271 28 August 1998 (28.08.98) US (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERA PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; Suite 160, 100 Technology Drive, Broomfield, CO 80021 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): QIU, Zhihau [CN/US]; 5840 West 112th Place, Westminster, CO 80021 (US). MAHIOU, Belaid [US/US]; 13493 Quivas Street, Westminster, CO 80234 (US). (74) Agents: SWANSON, Barry, J. et al.; Swanson & Bratschun, L.L.C., Suite 200, 8400 East Prentice Avenue, Englewood, CO 80111 (US).	(81) Designated States: JP, KR, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF IMMUNOMODULATORY POLYSACCHARIDES FROM ALOE (57) Abstract The present invention provides a rapid and efficient method for the preparation and isolation of biologically active polysaccharides from Aloe. The present invention includes the activated mixture of polysaccharides (referred to herein as "Immuno-10"), produced by the methods of the invention. The invention also includes the use of the polysaccharides as immunostimulating, immunomodulating and wound healing agents. The resulting immunomodulatory complex has a higher activity and is more stable than bulk carbohydrates isolated using prior art alcohol precipitation schemes.		

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-520019

(P2001-520019A)

(43)公表日 平成13年10月30日(2001. 10. 30)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 P 19/14		C 1 2 P 19/14	4 B 0 6 4
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/715	4 C 0 8 6
A 6 1 P 17/02		A 6 1 P 17/02	4 C 0 9 0
37/02		37/02	
37/04		37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-516056(P2000-516056)
 (86) (22)出願日 平成10年10月9日(1998. 10. 9)
 (85)翻訳文提出日 平成12年4月7日(2000. 4. 7)
 (86)国際出願番号 PCT/US 98/21361
 (87)国際公開番号 WO 99/19505
 (87)国際公開日 平成11年4月22日(1999. 4. 22)
 (31)優先権主張番号 60/061, 681
 (32)優先日 平成9年10月10日(1997. 10. 10)
 (33)優先権主張国 米国 (US)
 (31)優先権主張番号 60/098, 271
 (32)優先日 平成10年8月28日(1998. 8. 28)
 (33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ユニバーラ ファーマスーティカルズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国80021 コロラド州, ブルームフィールド, テクノロジー ドライブ 100, スウィート 160
 (72)発明者 キウ, ズヒハウ
 アメリカ合衆国 コロラド, ウェストミンスター, ウェスト ワンハンドレッドアンドトゥエルブス プレース 5840
 (72)発明者 マヒオウ, ベライド
 アメリカ合衆国 コロラド, ウェストミンスター, クイバス ストリート 13493
 (74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アロエからの免疫修飾性多糖類の製法

(57)【要約】

本発明は、アロエから生物学的に活性な多糖類を分離及び調製するための迅速で効果的な方法を与える。本発明は、本発明の方法により製造された多糖類の活性混合物（ここでは「イミュノ-10」として呼ぶ）を含む。本発明は、その多糖類を免疫刺激剤、免疫修飾剤、創傷治癒剤として用いることも含む。得られる免疫修飾複合体は、従来のアルコール沈澱方式を用いて分離したバルク炭水化物よりも一層安定で、一層大きな活性度を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アロエ種から免疫修飾性炭水化物を分離する方法において、

- (a) アロエ種からアロエゲルジュースを抽出し、
 - (b) 前記アロエゲルジュース中の全多糖類の制御限定された加水分解を行い、
 - (c) 前記制御限定された加水分解を終結させ、次いで
 - (d) 場合により、前記アロエゲルジュースを脱色し濾過する、
- 諸工程を含む、上記方法。

【請求項2】 工程(b)を、アロエゲルジュースを、酵素又は化学的加水分解剤で処理することにより行う、請求項1記載の方法。

【請求項3】 酵素を、セルラーゼ、ペクチナーゼ又はマンナーゼからなる群から選択する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 酵素加水分解剤がセルラーゼであり、アロエゲルジュース216リットルに対しセルラーゼ0.5g～2.5gの割合で添加する、請求項2記載の方法。

【請求項5】 工程(b)を、25℃±1℃で2～2.5時間行う、請求項4記載の方法。

【請求項6】 工程(b)を、生物学的活性度を最大にする温度及び時間で行う、請求項1記載の方法。

【請求項7】 加水分解を加熱又は中和により終結させる、請求項1記載の方法。

【請求項8】 加水分解を、85～90℃に30～50分間加熱することにより終結させる、請求項5記載の方法。

【請求項9】 工程(d)を、アロエゲルジュースに木炭を添加し、次に前記アロエゲルジュースを、次第に気孔孔径が小さくなる一連のフィルタに通すことにより達成する、請求項1記載の方法。

【請求項10】 一連のフィルタが、30μmフィルタ、1μmフィルタ、及び0.7μmフィルタを含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】 シーライト、FW12又はFW14からなる群から選択された珪藻土物質を濾過助剤として工程(c)でアロエゲルジュースに添加すること

を更に含む、請求項9記載の方法。

【請求項12】 請求項1に記載の方法により製造された組成物。

【請求項13】 主にアロエから誘導された多糖類を含む組成物において、

(a) 前記組成物中の前記多糖類が、50～200kDaの範囲内で、70～80kDaの平均分子量を有し、

(b) 前記組成物中の前記多糖類が、D-ガラクトース（約5%以下）、D-グルコース（約5%以下）、及びD-マンノース（約90%）を含み、

(c) 前記組成物中の前記多糖類が、主に β -1, 4結合を有する単糖類を含み、しかも

(d) 前記組成物中の多糖類が、高度にアセチル化されて単糖類1分子当たり約一つのアセチル基を有し、該アセチル基が単糖類単位の2、3又は6位置にある、諸特性を有する、上記組成物。

【請求項14】 多糖類が微量のキシロース及びアラビノースも含む、請求項13記載の組成物。

【請求項15】 多糖類が、主に、1対9.6 \pm 2.2の比率でD-ガラクトース及びD-マンノースを含む、請求項13記載の組成物。

【請求項16】 免疫刺激剤、免疫修飾剤又は創傷治癒剤として、請求項1記載の組成物を使用する方法。

【請求項17】 請求項1に記載の方法により製造された組成物を、それを必要とするヒトに投与することによる、免疫不全症又は免疫抑制症の治療法。

【請求項18】 免疫刺激剤、免疫修飾剤又は創傷治癒剤として、請求項13記載の組成物を使用する方法。

【請求項19】 請求項13に記載の組成物を、それを必要とするヒトに投与することによる、免疫不全症又は免疫抑制症の処置法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、アロエからの多糖類を活性化及び精製するための方法に関する。詳しくは、本発明は、アロエから免疫修飾活性を有する多糖類を分離する方法に関する。本発明は、本発明の方法により製造された多糖類の活性混合物（今後「イミュノ(Immuno)-10」又は「イミュノ-10多糖類」と呼ぶ）を含む。本発明は、それら多糖類を免疫刺激剤、免疫修飾剤及び創傷治癒剤として使用することを含む。

【0002】

(背景技術)

アロエは多くの生物学的に活性な物質を含む複雑な植物である〔コーエン(Cohen)等、「創傷治癒／生化学的及び臨床的特徴」(Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects)、第1版、WBサウンダーズ(Saunders)、フィラデルフィア(1992)〕。300種以上のアロエの品種が知られており、それらの殆どがアフリカ原産である。研究により、生物学的に活性な物質はアロエの葉の三つの別々な部分、即ち葉の中心部、葉の堅い皮又は外皮の中に位置する透明ゲルフィレット(gel fillet)、及び葉の堅い皮と内部ゲルフィレットとの間に位置する維管束の内鞘細胞中に含まれているラテックスと呼ばれている黄色液体の中に存在していることが示されている。歴史的には、アロエ生成物は火傷、炎症及び他の創傷を処置するための外皮用薬として用いられてきた。これらの用途は、臨床効果、特に抗炎症活性を有するアロエからの化合物を同定する膨大な研究を引き起こしてきた〔例えば、グリンドレイ(Grindlay)、及びレイノルズ(Reynolds)、J. of Ethnopharmacology, 16:117-151 (1986); ハート(Hart)等、J. of Ethnopharmacology, 23:61-71 (1988)参照〕。これらの研究の結果として、抗腫瘍活性、抗酸活性〔ヒラタ及びスガ、Z. Naturforsch, 32c:731-734 (1977)〕、抗糖尿病活性、チロシナーゼ抑制活性〔ヤギ等、Planta medica, 515-517 (1987)〕、及び酸化防止活性〔国際特許出願Serial No. PCT/US95/07404、1996年12月19日公開、公開番号WO 96/40182〕を含

めた種々の生物学的活性を有するアロエ化合物の膨大な報告が存在する。

【0003】

アロエ生成物は免疫系を刺激することができることも報告されている。アロエが免疫系を刺激することができるのは、ゲル中に存在する多糖類に起因するものであるとされている〔例えば、デイ(Day)等、J. Am. Pharm. Assoc., 11:462-463 (1922);フラッグ(Flagg)、American Perfumes and Aromatics, 74:27-28, 61 (1959); ウォラー(Waller)等、Proc. Okla. Acad. Sci., 58:69-76 (1978); シュチャーブクヒン(Shcherbukhin)等、Applied Biochemistry & Microbiology, 15:892-896 (1979); マンダル(Mandal)等、Carbohydrate Research, 86:247-257 (1980); マンダル等、Carbohydrate Research, 87:249-256 (1980); ウィンターズ(Winters)等、Eco. Botany, 35:89-95 (1981); ロブソン(Robson)等、J. Burn Care Rehab., 3:157-163 (1982); イワン(Ivan)等、Drug & Cosmetic Ind., 52-54, 105-106 (1983); スモサーズ(Smothers)、Drug & Cosmetic Ind., 40:77-80 (1983); マンダル(Mandal)等、Indian J. of Chem., 22B:890-893 (1983); ビルカス(Vilkas)等、Biochimie, 68:1123-1127 (1986); ウォラー(Waller)等、Cosmetic Toiletries Manufacturing Worldwide, 64-80 (1994); マクアナリー(McAnalley)等、米国特許第5, 308, 838号を参照〕。

【0004】

アロエ生成物は、紫外線の有害な影響に対し皮膚を保護するため化粧品工業でも広く用いられている〔グロリエ(Grollier)等、1987年4月7日発行、米国特許第4, 656, 029号〕。皮膚を紫外線に慢性的に露出すると、人間及び実験動物で皮膚癌を起こす。実験動物の皮膚を紫外線B(UVB)放射線(280-320nm)に露出すると、皮膚免疫系の抑制を起こし、それがUV誘発皮膚癌、接触感作ハプテン及び種々の感染性微生物に対し、免疫反応を起こす能力を損なう〔ストリックランド(Strickland)、J. Invest. Dermatol., 102:197-204 (1994)及びそこに引用された文献を参照〕。ストリックランド等による研究では、アロエ・ベラ(vera)ゲルを局部的に適用すると、UVB露出により起こされた免疫系の抑制を減ずることが示されている〔ストリックランド、J. Invest. Dermatol., 102:197-204 (1994)〕。

【0005】

自然のままの(未変性の, native)ゲルの免疫系の抑制を減ずる能力は非常に低く、不規則であり、時間と共に低下する。一つの仮説は、UV-B保護因子がアロエ植物中に自然に存在する酵素によって加水分解され且つ(又は)細菌による劣化を受けることである。従って、アロエから多糖類を分離することは、その免疫修飾活性を保持するのに役立つものと思われる。しかし、アロエから多糖類をバルク(bulk)分離するための従来法は、免疫修飾活性を効果的に保持させるものではなかった。例えば、米国特許第4,957,907号、第4,966,892号及び第5,356,811号明細書に記載されているこれらの方法は、長時間(4~24時間)のアルコール沈澱及び遠心分離工程を用いている。従来法ではアロエゲルの免疫修飾活性を効果的に保持することができないことを考慮すると、免疫修飾活性を維持し、安定化することができるアロエからの多糖類分離法を得ることは有用であろう。本発明は、そのような方法を与えるものである。

【0006】

(発明の開示)

本願は、アロエから多糖類の混合物を活性化し、分離する方法に関する。本発明には、生成した多糖類の活性混合物及びその混合物を免疫刺激、免疫修飾、及び創傷治癒剤として使用することが含まれる。本発明の方法により分離された多糖類の活性度は、自然のままのアロエゲル抽出物のものよりも遥かに高く、遥かに安定であり、再現性がある。

【0007】

本発明の方法は、(a)アロエからアロエゲルジュースを抽出し、(b)前記アロエゲルジュース中の全多糖類の制御限定された(controlled limited)酵素加水分解を、限定された炭水化物加水分解に適した温度及び時間行い、(c)前記加水分解を終結させ、そして(d)場合により、前記加水分解された生成物を脱色及び濾過することからなる。好ましい態様として、限定加水分解は、 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で2~2.5時間、ゲル抽出物216リットルに対しセルラーゼを0.5g~2.5gの比率で添加して行う。本方法の概略図を図1に示す。

【0008】

本発明は、本発明の方法により製造され、分離された多糖類の混合物（ここでは「イミュノー10」又は「イミュノー10多糖類」と呼ぶ）が含まれる。前記組成物は下に詳細に記述する特性を有する

【0009】

本発明は、イミュノー10を、免疫刺激剤、免疫修飾剤及び創傷治癒剤として使用することも含む。イミュノー10は、UVB放射線に曝したマウスの接触過敏症（CH）の抑制を防ぎ、ヒト類表皮癌細胞系のUVB照射誘発腫瘍壊死因子（TNF- α ）放出も阻止する。本発明の方法により分離されたイミュノー10は、ヒト免疫系の回復又は刺激のための経口又は局所用処方剤として、免疫不全症又は免疫抑制症を患っている患者、又はHIV等の病気の治療処置のために用いることができる。本発明の方法により分離されたイミュノー10は、創傷治療のためにも有用である。本発明の方法により分離された多糖類は、自然のままのアロエゲルよりも一層活性で、一層安定である。

【0010】

ここに記載した方法は、アロエ多糖類の限定及び制御された加水分解を含み、それはアロエ多糖類の安定性及び免疫修飾活性を増大する働きをする。本方法は、従来法よりも速く、簡単で、規模の増大を一層し易く、有機溶媒の使用を含まない。更に、ここに記載する方法は、アロエ多糖類の溶解度を増大し、免疫修飾活性の損失を起こすことなく、その溶液の粘度を低下する。本発明の方法を用いて分離されたイミュノー10は、同じアロエゲル抽出物から精製された活性化バルク多糖類と定性的に同じUVB保護活性を示すが、バルク多糖類よりも大きな比活性度を有する。更に、精製されたイミュノー10は、自然のままのアロエゲルのものよりも少なくとも2倍の高さのUVB CH回復活性度を示す。

【0011】

前記一般的説明及び次の詳細な説明の両方共、例及び説明のためだけのものであり、特許請求した発明を限定するものではないことを理解すべきである。

【0012】

（本発明の詳細な説明）

本願は、アロエからの規定した生物学的に活性な多糖類混合物を活性化及び分

離する方法について記述する。用語「アロエ」とは、Aloe barbadensis植物を一品種とするユリ科の世界的に分布している植物属を指す。本発明の方法は、(a)アロエからアロエゲルジュースを抽出し、(b)前記アロエゲルジュース中の全多糖類の制御限定された加水分解を、限定された炭水化物の加水分解に適した温度及び時間行い、(c)前記加水分解を終結させ、そして(d)場合により、前記加水分解された生成物を脱色及び濾過することからなる。

【0013】

本発明の方法の概略図を図1に与える。図1に関し、アロエゲルジュース (A G J) は、粉碎に限定されないが、それを含めた当分野で既知のいずれかの方法により、「トンプソン・アロエ・ジュース・抽出器」(Thompson Aloe Juice Extractor) [テキサス州ハーリングンのトンプソン・マニュファクチュアリング社 (Thompson Manufacturing Co.)] を用いるか、又は加圧ローラを用いることにより、新鮮なゲルフィレットから得られる。次に A G J を加水分解剤と混合する。加水分解剤の例には、セルラーゼ、ペクチナーゼ、又はマンナーゼ等の酵素、及び塩酸及びトリフルオロ酢酸等の非酵素系加水分解剤が含まれるが、それらに限定されない。最も好ましい加水分解剤は、セルラーゼ 4000 [バレイ・リサーチ社 (Valley Research Inc.)] 等のセルラーゼである。得られた混合物を、限定された炭水化物加水分解に適した温度及び時間インキュベートする (例1参照)。例えば、加水分解剤がセルラーゼである場合、これは、 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で2~2.5時間、ゲル抽出物216リットルに対しセルラーゼを0.5g~2.5gの割合で用いて行うのが好ましい (例4を参照)。

【0014】

次に適当な時間の後、炭水化物の加水分解を停止する。もしセルラーゼを用いたならば、これは、消化混合物を高温に加熱することにより達成するのが好ましい。得られたイミュノー10はこの段階では赤い色をもち、この色は場合によりそのイミュノー10を木炭(チャコール, charcoal)粒子と混合してスラリーを形成する (例1参照) か、又はカラムクロマトグラフィーにより除去することができる。適当なクロマトグラフィー樹脂の例には逆相樹脂が含まれるが、それらに限定されない。逆相樹脂の例には、XADシリーズの樹脂、CG-161等の芳

香族系樹脂、及びC-4、C-8、C-18等の非芳香族系樹脂が含まれるが、それらに限定されない。好ましい態様として、そのようなイミュノー10スラリーを濾過し、木炭粒子を除去する。これは、当分野で既知の方法のいずれかにより達成することができる。本発明の好ましい態様では、多段階濾過方式を用い、この場合、スラリーを次第に気孔孔径が小さくなる一連のフィルタに通す（例1及び表1及び2参照）。例えば、或る態様では、スラリーを30 μm の濾紙に通し、次に1.0 μm の濾紙、最後に0.7 μm の濾紙で濾過する。或る態様では、シーライト、FW12、FW14等の濾過助剤を、濾過すべき混合物中に含有させる。この方法を用いた濾過に続き、濾液を脱色し、木炭微粒子を除去する。

【0015】

任意的脱色及び濾過に続き、イミュノー10を凍結乾燥又は噴霧乾燥により乾燥して貯蔵してもよい。本発明の方法を用いた典型的な収率は、AGJ1リットル当たり冷凍乾燥固体約6gである。セファロース(Sepharose) CL-4Bカラムによるイミュノー10のクロマトグラフィーでは、490nmでの二つの炭水化物ピークの存在により証明されるように、多糖類及び単糖類の両方のフラクション(fractions)をそれが含んでいることを示している（図2）。免疫調節活性は多糖類ピーク内に含まれているが、単糖類はこの活性度に影響は与えない（データは示さず）。単糖類は、限定された酵素による硝化の前に、AGJのダイアフィルトレーション(diafiltration)/透析により除去することができる。

【0016】

例2及び3では、一層大きな生物学的活性及び安定性を有するイミュノー10の純粋な形のものである医薬級イミュノー10の製法を記述する。

【0017】

本発明には、本発明の方法により製造された活性化多糖類（ここでは「イミュノー10」又は「イミュノー10多糖類」と呼ぶ）が含まれる。

【0018】

イミュノー10の活性化多糖類の組成及び化学的構造を、次のように、95%より大きな純度を有する医薬級イミュノー10を用いて決定した。

【0019】

サイズ排除クロマトグラフィー分析は、イミュノー10中の多糖類の平均分子量は70~80 kDaで、分子量の範囲は50~200 kDaであることを示す。分子量は、セファデックス(Sephadex) G-100カラムによるサイズ排除クロマトグラフィー及びセファロース12カラムによるHPLCゲル浸透クロマトグラフィー〔H10/30ファーマシア(Pharmacia)〕を用いて決定した。

【0020】

単糖類組成の分析では、イミュノー10の多糖類は、D-ガラクトース(約5%以下)、D-グルコース(約5%以下)及びD-マンノース(約90%)を含有することが示されている。イミュノー10中の多糖類は微量のキシロース及びアラビノースも含んでいる。

【0021】

一層高度に精製された医薬級イミュノー10(例2及び3参照)は、主にD-ガラクトース及びD-マンノースを1対9.6±2.2の比率で含んでいる。

【0022】

プロトン及び¹³C NMR分光分析では、単糖類結合は主にβ-1,4結合であることが示されている。プロトン¹³C-NMRスペクトルをバリアン(Varian) XL-300分光計で分析した。イミュノー10多糖類の主な構造はβ-1,4グルコマンナンである。更に、多糖類は高度にアセチル化されている(平均一つの砂糖残基当り約一つのアセチル基)。単糖類単位の2,3及び6位置は、独立に-OH又は-OAcで置換されていてもよい。

【0023】

イミュノー10のクロマトグラフィーは、それが多糖類及び単糖類の両方のフラクションを含んでいることを示す(図2参照)。活性化多糖類の単糖類組成は、ジオネックス(Dionex) Bio-Lc装置を用いてパルス電流検出器を有するジオネックス・カルボパック(CardoPac) PA1カラムによる高性能陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)により決定した。免疫調節活性は多糖類ピーク内に含まれているが、単糖類はこの活性度に影響を与えない(データは示さず)。イミュノー10は、その活性度に影響を与えない種々の塩を含んでもよい。

【0024】

イミュノー10は、その生物学的活性を失うことなく熱及び蛋白分解酵素処理に対し安定であり、そのことは、更にイミュノー10の生物学的活性が活性多糖類に起因するものであることを示している。

【0025】

本発明の方法により分離されたイミュノー10は、従来知られていた方法を用いて分離されたアロエ多糖類よりも大きな安定性を有する。例5及び6（図5～8）は、多糖類を処理する方法とその安定性との間の関係を例示する。

【0026】

本発明は、免疫刺激、免疫修飾及び創傷治癒剤としてイミュノー10を使用することも含む。

【0027】

免疫修飾活性

イミュノー10は、UVB抑制免疫反応（接触過敏症）を回復し、ケラチノサイト（ヒト類表皮癌細胞、KB細胞）からのUVB誘発腫瘍ネクロシス因子 α （TNF- α ）放出を阻止する。

【0028】

局部的抑制モデルを用いて、例7で概略的に述べるように、イミュノー10の回復活性としてここで言及するUVB抑制皮膚免疫機能を逆転させるイミュノー10の能力を決定した〔ストリックランド、J. Invest. Dermatol., 102:197～204（1994）〕及びビンセク(Vincek)等、Cancer Research, 53:728（1994）を参照（これらは言及することによって本明細書に組み入れる）。局部的抑制モデルでは、C3H/HeNマウスを低い線量のUVB放射線に露出し、それが照射側に適用されたハプテンに対する接触過敏症（CH）反応の誘発を阻止する。簡単に述べると、マウスの腹部の毛を剃り、 2000 J/m^2 のUVB放射線で照射し、然る後、既知のビヒクルであるアクアフォール(Aquaphor)中に入れたイミュノー10（ 0.25 mg/ml ）をその照射した部位に塗った。3日後、マウスの照射した部位に2, 4-ジニトロベンゼン（DNFB）（ 0.3% 、 $50\text{ }\mu\text{l}$ ）を適用することにより感作した。6日後、マウスの耳の厚さを測定し、次にマ

ウスの耳の両側にDNFB (0.2%、 $5\mu\text{l}$)を適用することによりマウスを試験した。24時間後、マウスの耳の厚さを再び測定した。結果を図8に示す。

【0029】

行った実験の殆どで、UVB露出は80~100%CH反応を阻止した。図8に関して、このグループは陰性(抑制)対照(CH反応0%)として用いた。マウスの陽性対照群はUVB照射を受けておらず、イミュノ-10で処置されていない(ビヒクルのみ)が、感作され、試験された(CH反応100%)。マウスのビヒクル(ブランク)対照群はUVB照射を受けておらず、イミュノ-10で処置されておらず(ビヒクルのみ)、感作されていないが試験した。この群は化学的刺激試験によって起こされた真の耳腫脹の差を求めるのに用いた。イミュノ-10で処置したマウス群を抑制対照と同じやり方で処置した。但しそれらのマウスはビヒクルのみではなく、ビヒクル中にイミュノ-10を入れたもので処置した。イミュノ-10による回復率は、次の式を用いて計算した。

【0030】

$$\text{回復率}\% = (A - B) / (C - B) \times 100$$

(式中、A=イミュノ-10処置群の真の耳腫脹-ブランク群の真の耳腫脹；

B=抑制群の真の耳腫脹-ブランク群の真の耳腫脹；及び

C=陽性群の真の耳腫脹-ブランク群の真の耳腫脹)。

【0031】

回復率%が大きい程、イミュノ-10の活性は大きい。図8から分かるように、イミュノ-10の活性度は30~80%であり、平均約60%である。イミュノ-10を溶液として4℃で3カ月貯蔵するか、又は固体状態で室温で1年間貯蔵した場合、免疫修飾活性は安定していた。

【0032】

UVB誘発TNF- α 放出は、表皮内局部的免疫抑制の仲介に含まれていることが報告されている。イミュノ-10によるUVB誘発TNF- α 放出の抑制を決定するため、生体内モデルが開発された。この方法は例8に記載されている。ヒト類表皮癌細胞系(KB細胞)を用いた(正常な細胞はELISAにより測定できる程充分なTNF- α を生じない)。結果を図9に示す。図9中のX軸は、

イミュノロー１０の投与量（細胞媒体中の最終的濃度 mg/ml ）を表す。Ｙ軸は、イミュノロー１０による阻止率％を示す。イミュノロー１０による阻止％は、次の式を用いて計算した：

$$\text{阻止率}\% = 1 - (A - B) / (C - B) \times 100$$

($A = \text{UVB}$ 照射及びイミュノロー１０処置細胞からの媒体中の $\text{TNF-}\alpha$ 量；

$B = \text{UVB}$ 照射をしない細胞からの媒体中の $\text{TNF-}\alpha$ 量；及び

$C = \text{UVB}$ 照射し、イミュノロー１０処置なしの細胞からの媒体中の $\text{TNF-}\alpha$ 量)。

【0033】

図９から分かるように、イミュノロー１０は、 KB 細胞からの UVB 誘発 $\text{TNF-}\alpha$ 放出阻止の投与量依存性を示している。 $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度では、イミュノロー１０は殆ど１００％その放出を阻止した。

【0034】

免疫刺激活性

イミュノロー１０は、 $\text{TNF-}\alpha$ 放出を刺激することによりマクロファージを活性化する。

【0035】

悪性腫瘍に対する宿主防衛は、幾つかの異なった機構からなり、免疫学的防衛の障害又は低下は、悪性疾病の発生又は進行をもたらすことがある。マクロファージは抗原処理細胞であり、細胞毒性及び食細胞性の両方をもつことが示されている。これらの機能のいずれも、マクロファージが活性化されると著しく向上する。この細胞集団の選択的刺激が、治療的用途の開発に寄与させるのに重要であろう。活性化されたマクロファージは、人体の創傷治癒能力に決定的に重要なものになっている。マクロファージにより放出されるシトキンの一つである腫瘍壊死因子 α ($\text{TNF-}\alpha$) は、防衛システムのシグナル導入を仲介するのに重要な役割を果たす。例９には、イミュノロー１０刺激マクロファージ活性化を決定するのに用いた方法が記載されている。結果を図１０に示す。図１０に示す通り、イミュノロー１０によりマウス腹膜のマクロファージから放出された $\text{TNF-}\alpha$ の投与量依存性刺激が検出された。 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のイミュノロー１０濃度では、イミュ

ノー10刺激マクロファージは、無刺激細胞よりも500倍も多くのTNF- α を放出した。図10から分かるように、同じ実験条件下で、自然のままのアロエゲルは、マクロファージからのTNF- α 放出を誘発しなかった。この結果は、イミュノー10を免疫系の非特異性刺激物及び創傷治癒のための両方として用いることができることを示している。

【0036】

傷治癒活性

イミュノー10は線維芽細胞の増殖を刺激する（子供ハムスター腎臓細胞、BHK-21細胞）。

【0037】

例10には、イミュノー10細胞増殖を決定するために用いた方法が記載されている。刺激された細胞増殖を決定するためにMTT法を用いた。結果を図11に示す。図11から分かるように、イミュノー10は、投与量に依存した仕方でBHK-21細胞の増殖を刺激する。

【0038】

次の例は例示のためにのみ与えられており、本発明の範囲を限定するものではない。

【0039】

(諸例)

例1. イミュノー10の分離及び精製

図1に概略示すように、イミュノー10を分離し精製した。簡単に述べると、新しいAloe barbadensisゲル抽出物を、限定された炭水化物加水分解に適した温度及び時間、限定された酵素による消化にかけた。これは、酵素としてセルラーゼを用い、25℃で2時間であるのが典型的である。活性化アロエゲルを活性炭及び濾過（I-10）を用いて或る程度精製した。次にその活性化多糖類を、更に透析、エタノール沈澱及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

【0040】

限定酵素硝化

新しいゲルフィレット〔テキサス州ハーリンゲンのアロエコープ(Aloecorp)に

より与えられたもの〕から生成したアロエゲルジュース (AGJ) (10リットル) を、マリン・プロペラ・ブレード (marine propeller blade) (A100) を具えた機械的攪拌器で穏やかに攪拌しつつ、60℃の温水が循環する1/4インチ316ステンレス鋼コイルからなる熱交換器により25℃に加熱した。セルラーゼ4000 (バレイ・リサーチ社) 116 mg を50 mMクエン酸水溶液10 ml 中に入れた pH=6 の溶液を添加し、混合物を2時間穏やかに攪拌した。

【0041】

酵素不活性化

2時間後、反応混合物を最低30分間の間約90℃に加熱した。次に反応混合物を氷水浴中に浸漬し、その材料を室温へ冷却した。

【0042】

脱色及び濾過

酵素不活性化中に発生した赤い色を除くため木炭を用いた。材料を二つの5.0リットルのバッチに分けた。5.0リットルバッチの各々に100.0 gの粗い木炭〔ノリット (Norit) から購入したダルコ (Darco) 20×40〕を添加し、混合物を室温で1時間穏やかに攪拌した。次に50.0 gのシーライト545 (アルドリッチ・ケミカル社) を添加し、そのスラリーを更に10分間攪拌した。

【0043】

次にスラリーを、30 μ mの濾紙〔ワットマン (Whatman) 級113〕を具えた加圧フィルタへポンプで送り、固体を除去した。濾液は少量の、フィルタを通過した木炭微粒子を含んでいた。その材料を、100 gのシーライト545で被覆した0.7 μ m濾紙 (ワットマン GF/F) の上に1.0 μ m気孔孔径の濾紙 (ワットマン #1) を重ねたものからなる2枚重ねのフィルタに通して濾過すると、透明になった。濾液は脱色されており、木炭微粒子を含んでいなかった。活性化多糖類を、更に透析、エタノール沈澱及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。濾過データを表1及び2に要約する。

【0044】

【表1】

表1. 第一濾過

パラメータ	値
スラリー体積	5 リットル
濾紙	ワットマン#113
気孔孔径	30 μm
フィルタ助剤	無し
濾過面積	113 cm^2
最大圧力	< 1 p s i
平均濾過速度	7.0 ml / 分 / cm^2
液体回収率	定量的
材料外観	木炭微粒子含有

【0045】

【表2】

表2. 第二濾過

パラメータ	値
スラリー体積	5 リットル
濾紙 (組合せ)	ワットマンGF/Fの上ワットマン#1
気孔孔径	0.7 μm の上1.0 μm
フィルタ助剤	100 gのシーライト545
濾過面積	113 cm^2
最大圧力	2 p s i
平均濾過速度	0.74 ml / 分 / cm^2
液体回収率	定量的
材料外観	透明

【0046】

凍結乾燥

濾過後、二つのバッチを一緒にし、その材料を凍結乾燥皿に移し、20リットルのビールティス(VirTis)凍結乾燥器中で凍結し、乾燥し、57.14gのイミュノ-10を生成させ、それはAGJ1リットル当り5.71gのイミュノ-10に相当していた。

【0047】

例2. 中空繊維カートリッジを用いた医薬級イミュノ-10の製造

10gの凍結乾燥したアロエゲルを、2リットルビーカー内で1.8リットルの蒸留水中に溶解した。スラリーを一晩4℃で攪拌し、均一な混合物を生成させた。その混合物を濾紙(ワットマン#3)に通して濾過し、全ての粒子を除去し、濾液の体積を2リットルに調節した。混合物を室温へ持って行き、4.63mgのセルラーゼ4000(バレイ・リサーチ社)を50mMのクエン酸水溶液5ml中へ入れたpH6の溶液を添加した。次に濾液を10~15psiの導入圧力で中空繊維カートリッジ〔A/Gテクノロジー社(Technology Corporation)、UFP-5-E-6、分子量カットオフ:5000Da〕へポンプで送った。5,000Daより小さな分子量を有する透過物を別の2リットルビーカーに収集した。5,000Da以上の大きな分子量を有する濃縮物を出発濾液と同じビーカー中に収集した。この混合物を連続的に攪拌し、出発濾液の体積が1リットルに減少した時、蒸留水(1リットル)を添加して体積を2リットルに戻した。この手順を5回繰り返した。合計三つの2リットル透過液部分を収集した。最終濃縮物を保持された部分のまま収集した。各2リットルの透過液部分を収集するのに平均約2.5時間かかった。それら部分を凍結乾燥皿に移し、20リットルのビールティス凍結乾燥器中で凍結し、乾燥した。透過液部分I、II及びIII、及び保持部分の収率は、夫々4.88g、1.77g、0.56g、及び0.37gであった。保持部分は、UVB抑制接触過敏症を回復するのに最も高い活性度を持っていた。透過物の部分IIIは、UVB抑制接触過敏症を回復するのに中程度の活性度を持っていた。透過物の部分I及びIIは不活性であった。

【0048】

例3. 医薬級イミュノー10の製法

例1に記載した方法により製造されたイミュノー10(50g)を蒸留水(d i H₂O)中に溶解し、最終体積を200mlにした。次にエタノール(66.7ml、最終濃度25%)をこの溶液に添加した。エタノールの添加は攪拌しながらゆっくり行なった。次に溶液を更に30分間攪拌し、その間に沈澱が形成された。混合物を2500rpmで10分間遠心分離にかけ〔ジョアン(Jouan) CR412〕、沈澱物を25%エタノールで1回洗浄し、遠心分離にかけ、再びd i H₂O中に溶解した。得られた溶液を乾固するまで冷凍乾燥した(pp t/25%)。更に133.3mlのエタノール(25%~50%)を、上に記載したように上澄み液に添加し、その溶液を再び30分間攪拌し、沈澱物を収集し、50%エタノールで洗浄し、冷凍乾燥した(pp t/25%~50%)。この方法を更に2回、50~75%エタノール(pp t/50%~75%)及び75~80%エタノール(pp t/75%~80%)で繰り返した。pp t/25%、pp t/25~50%、pp t/50~75%、及びpp t/75~80%の場合の沈澱物の固体回収率は、夫々0.3%、20.5%、10.3%及び1.5%であった。pp t/50~75%の生成物をセファデックスG-100カラム(2.5×68cm)で分別した。多糖類ピーク(図3の左のピーク)のフラクションを一緒にし、冷凍乾燥して医薬級イミュノー10を生成させた。pp t/50~75%からの医薬級イミュノー10の回収率は15.8%であった。

【0049】

例4. アロエ・ベラ・ゲル(AJG)多糖類の時間依存性分解

新しいアロエ・ベラ・ゲル抽出物をセルラーゼ(ゲル抽出物1リットル当たり1.57mgのセルラーゼ)により室温で3分間、10分間、30分間、60分間、120分間、24時間、及び48時間処理した。処理が終わった時、ゲル抽出物を水浴中で95℃に30分間加熱し、次に2500rpmで10分間遠心分離にかけた。上澄み液を乾固するまで冷凍乾燥した。処理したゲル抽出物中の多糖類の分子量分布を、セファデックスG-75カラム(2.5×68cm、カラムへの試料導入量177~179mg)によるサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。75,000Da以上の分子量を有する多糖類は空洞体積に溶離

され、一方単糖類及び或るオリゴ糖類はカラム体積に溶離された(図4参照)。得られた生成物の生物学的活性に基づく好ましい加水分解反応時間は、120分であると決定された。図4から分かるように、120分間のセルラーゼによる処理は、肩の無い鋭い多糖類ピークを与える結果になった(▲)。24時間(●)又は48時間(■)のセルラーゼによる処理は、単糖類及びオリゴ糖類ピークの吸収率が増大しながら、多糖類ピークの吸収率の著しい低下をもたらした。3分間(◇)、10分間(○)及び30分間(△)の処理により得られた生成物は、肩を有する多糖類ピークを与える結果になった。

【0050】

例5. 異なったアロエ製剤中のアロエ多糖類の安定性

新しいアロエゲル抽出物(標準的精製法、即ち、透析及びエタノール沈澱を用いて精製したもの)、冷凍乾燥アロエゲル、及び冷凍乾燥アロエ全葉中の多糖類の安定性を、セファローズCL-4Bカラムによるサイズ排除クロマトグラフィーにより研究した(図5参照)。図5から分かるように、新しいアロエゲル抽出物から分離されたアロエ多糖類は、~200万Daの分子量を持っていた。冷凍乾燥したアロエ全葉中の多糖類は、新しいアロエゲル抽出物から分離した多糖類の分子量よりも小さい分子量を持っており、冷凍乾燥したアロエゲル中の多糖類は~500,000Daの分子量を持っていた。この結果は、多糖類の処理方法と、アロエ多糖類の安定性との間の関係を例示している。

【0051】

例6. イミュノ-10多糖類の安定性

イミュノ-10は、多糖類の外に或る塩及び他の小さな分子を含んでいる。蒸留水(d i H₂O)中のイミュノ-10のpHは約4.3である。イミュノ-10多糖類の安定性を研究するために、精製した自然のままのアロエ多糖類と、pH4.3又はpH7.8のイミュノ-10溶液との両方を室温で3カ月間放置した。微生物の増殖を阻止するためイミュノ-10又は多糖類の溶液に最終濃度0.02%のアジ化ナトリウムを添加した。これらの試料中の多糖類の分解をセファデックスG-100カラムにより分析した。図6は、クロマトグラムが490nmでのイミュノ-10の多糖類吸収率が吸光度がpH4.3及びpH7.8の

両方で非常に似ていることを示していることを描いた図である。pH 4.3では多糖類ピークは僅かに右側に移行しているが、それは、出発材料と比較して両方のpH条件下で依然として非常に安定である。同じ条件下で、自然のままの精製多糖類はpH 7.8で部分的に分解した(図7)。多糖類ピークの僅かな移行は、セファデックスG-100カラムの再充填によるものであろう。

【0052】

例7. イミュノ-10によるUVB抑制接触過敏症回復の決定

SPF雌C3H/HeNマウスを、ハーラン・スプラグ・ダウリー(Harlan Sprague Dawley)から入手し、ナショナル・リサーチ・カウンシル・オブ・ラボラトリー・アニマル・ケア(National Research Council of Laboratory Animal Care)ガイドラインに従って病原体を持たない施設に保管した。9~10週間の年齢適合マウスを用いて各実験を行った。

【0053】

マウスの腹部の毛を電気バリカンで除去した。次にアルミ箔で耳を覆ったマウスを一系列の四つの無フィルタFS40太陽灯〔ナショナル・バイオロジカル社(National Biological Corp.)〕に 2000 J/m^2 の線量で露出した。これらのランプから発したエネルギーの約65%がUVB範囲(280~320)内に入っており、最大放射光は313nmであった。UVB照射後、直ちにアクアフォール(Aquaphor)(ビヒクル)単独又はアクアフォール中に1:1の比率で入れた試験化合物をマウスの腹部皮膚上に適用した。次にマウスを、それらの刈った腹部皮膚の上に $50\mu\text{l}$ の0.3%ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)を、UVB照射後3日間適用することにより感作した。感作後6日で各耳の背面及び腹面の両方の上に $5\mu\text{l}$ の0.2%DNFBを塗布することによりマウスを試験した。試験直前及び24時間後に工学用マイクロメータを用いて耳の厚さを測定した。耳の比腫脹を、感作せずに試験したマウス(ブランク群)から得られた値を差し引くことにより決定した。各処置群は5匹のマウスからなっていた。各実験には更に二つの対照群が含まれていた、即ち陽性対照群及び抑制群である。陽性対照群はUVB照射も処置も受けていないが、感作して試験した(100%反応)。抑制マウス群は、UVB照射を受けていたが、処置はされておらず、感作し

て試験した(0%反応)。結果を図8に示す。

【0054】

例8. イミュノ-10によるUVB誘発TNF- α 放出抑制の決定

ヒト類表皮癌細胞(KB)を100mm皿で 2×10^6 個の細胞を培養した。細胞が集密化した(reached confluence)後(約2日)、それらをPBSで3回洗浄し、UVB放射線に 300 J/m^2 で露出した。次にそれら細胞をPBSで1回洗浄し、イミュノ-10を入れた又は入れない5mlのDMEM/0.2% FBS中で1時間培養した。細胞をPBSでもう1度洗浄し、更に増殖媒体中で一晚培養した。次の日に媒体を収集し、2500rpmで10分間4℃で遠心分離にかけた。上澄み液中に遊離されたTNF- α をELISAにより決定した。結果を図9に示す。

【0055】

例9. イミュノ-10によるマクロファージ活性化刺激の決定

ICRマウスからレジデントマウス腹膜マクロファージを分離し、96孔井戸型プレートに1孔当り200,000の細胞を植えた。2時間培養した後、付着していない細胞を除去するため細胞を3回洗浄した。次にイミュノ-10を用い、或は用いずにマクロファージを一晚培養した。媒体中に遊離したTNF- α をELISAにより決定した。陽性対照としてリポ多糖類(LPS)を用いた。結果を図10に示す。

【0056】

例10. イミュノ-10による細胞増殖(MTT)刺激の決定

子供ハムスターの腎臓細胞系(BHK細胞)を、96孔井戸型プレートに1孔当り5000個の細胞を植えた。組織培養器中で3日間イミュノ-10を用い又は用いずに細胞を培養した。次に細胞を 1 mg/ml のMTT〔臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,3-ジフェニルテトラゾリウム、チアゾリルブルー〕を用いて4.5時間培養した。0.01NのHCl中に入れた10%SD溶液100 μl を用いて細胞を抽出した後、570~630nmでの吸光度を決定した。線維芽細胞成長因子(FGF)を陽性対照として含ませた。結果を図11に示す。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

アロエからのイミュノー10を製造するための本発明の一般的方法を概略的に示す図である。

【図2】

限定された酵素加水分解、脱色及び濾過に続くイミュノー10のクロマトグラム(例1)の図である。クロマトグラフィーはセファローズCL-4Bカラムにより行い、フェノール硫酸法を用いて490nmでの吸光度を検査した。

【図3】

例3の方法により製造した或る程度精製したイミュノー10のクロマトグラムの図である。クロマトグラフィーはセファデックスG-100カラムにより行い、490nmでの吸光度を調べた。

【図4】

セルラーゼによりアロエ多糖類を3分間(◇)、10分間(○)、30分間(△)、60分間(◆)、120分間(▲)、24時間(●)、及び48時間(■)分解した場合を例示する図である。

【図5】

三つの異なった方法により分離したアロエ多糖類：既知の方法を用いた新しい抽出物から精製した多糖類(▲)、冷凍乾燥したアロエゲルから誘導した多糖類(■)、及びアロエ全葉から誘導された多糖類(●)；のクロマトグラムの図である。クロマトグラフィーはセファローズCL-4Bカラムにより行い、490nmでの吸光度を調べた。

【図6】

室温でpH4.3(○)及びpH7.8(●)のH₂O中に3カ月間放置した後のセファデックスG-100カラムによるイミュノー10のクロマトグラムの図である。

【図7】

室温でpH4.3(○)及びpH7.8(●)のH₂O中に3カ月間放置した後のセファデックスG-100カラムによる精製した自然のままのアロエ多糖類

のクロマトグラムの図である。

【図8】

皮膚免疫機能（接触過敏症UVB検定）を回復させるイミュノ－10の能力を示すグラフである。

【図9】

イミュノ－10によるUVB照射誘発腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）放出阻止を示すグラフである。

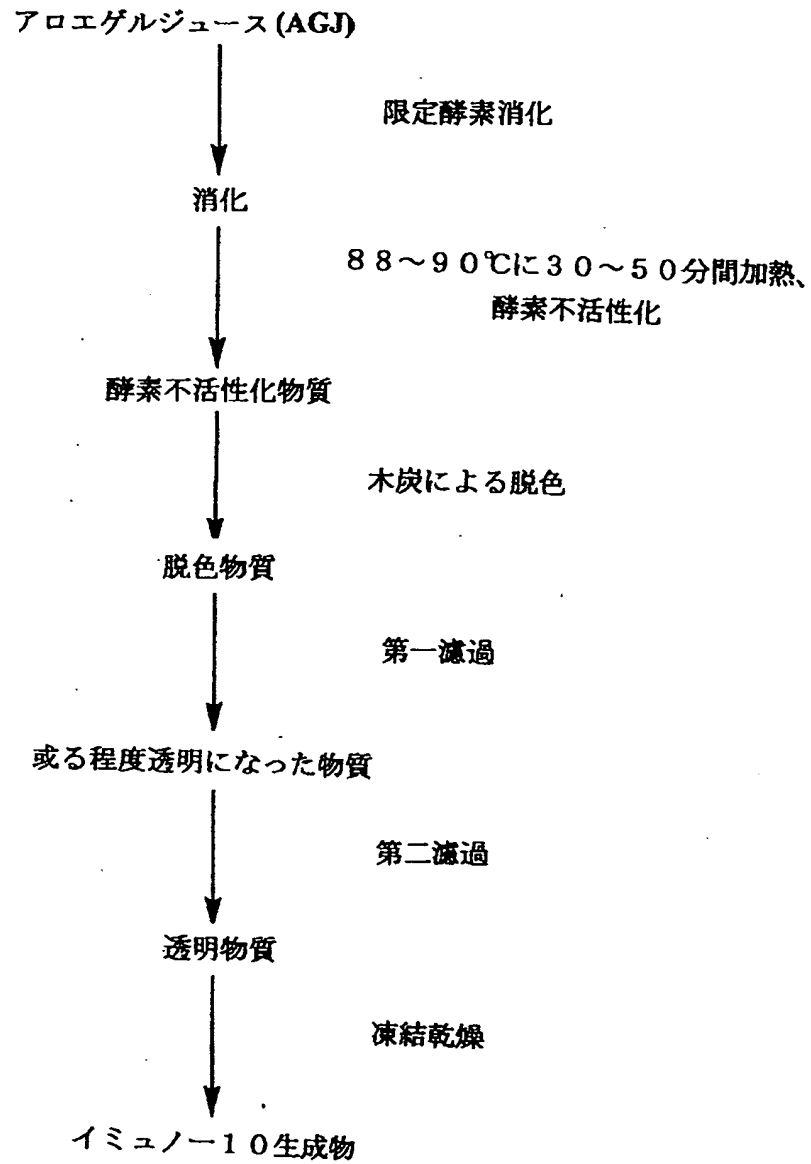
【図10】

イミュノ－10によるマウス腹膜マクロファージからのTNF- α 放出の刺激を示すグラフである。

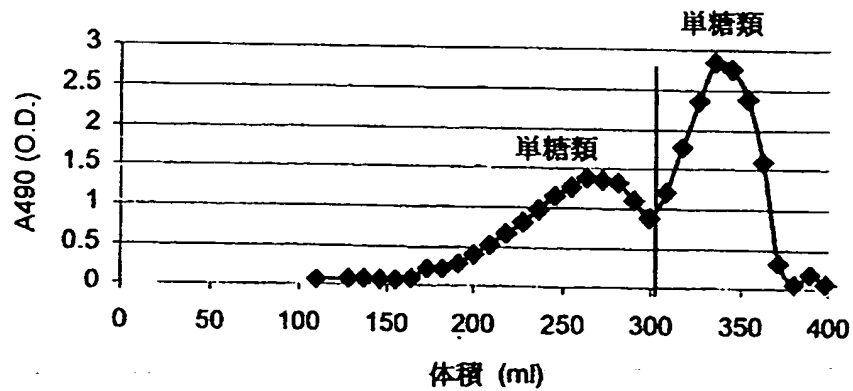
【図11】

イミュノ－10による細胞増殖の刺激を示すグラフである。

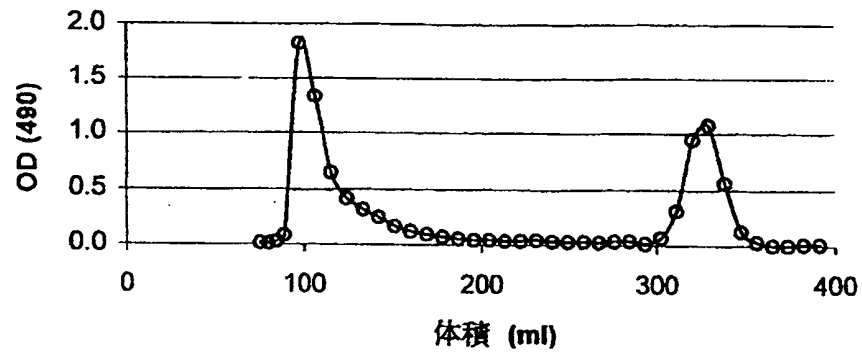
【図1】



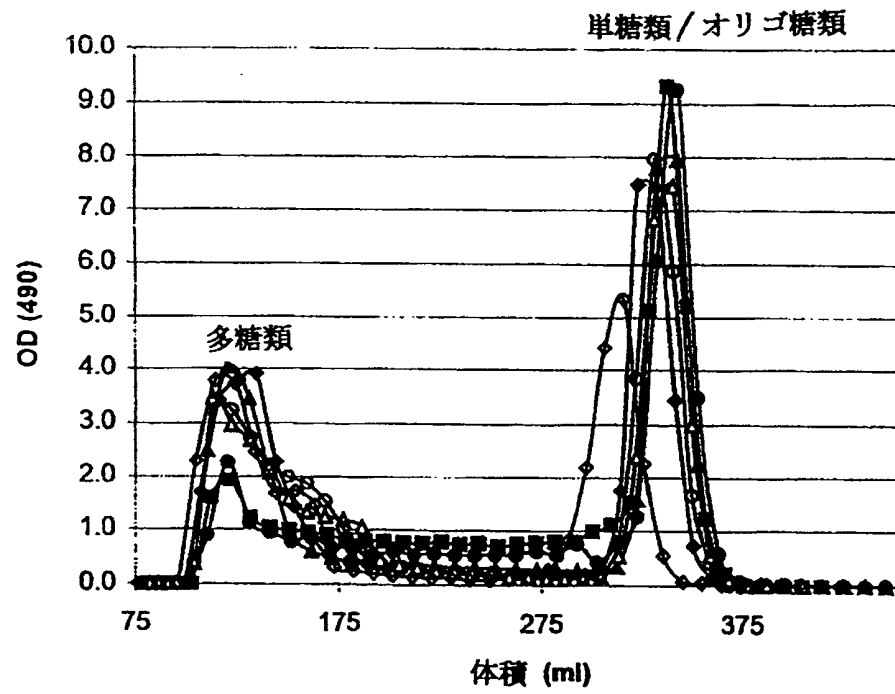
【図2】



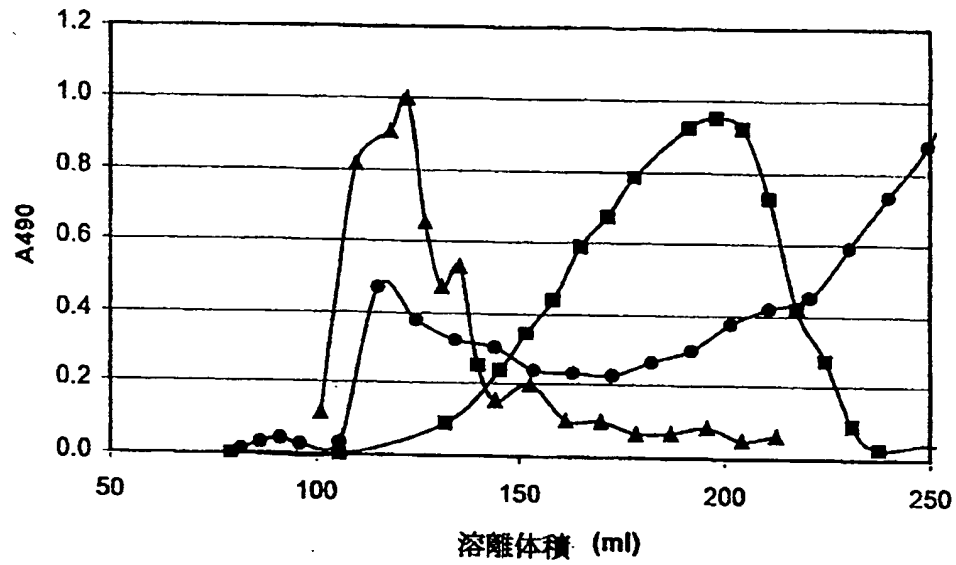
【図3】



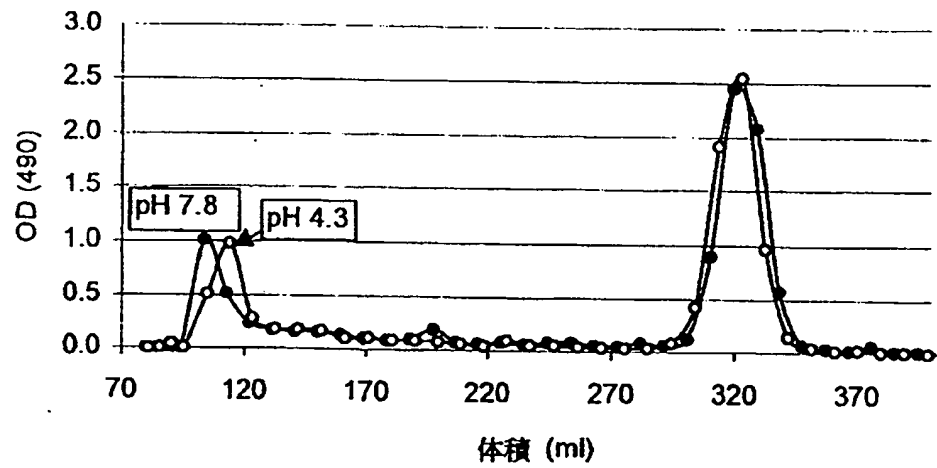
【図4】



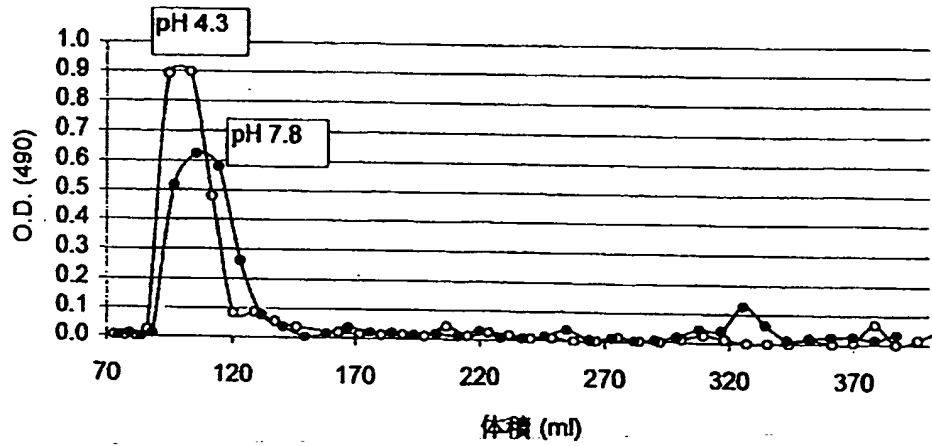
【図5】



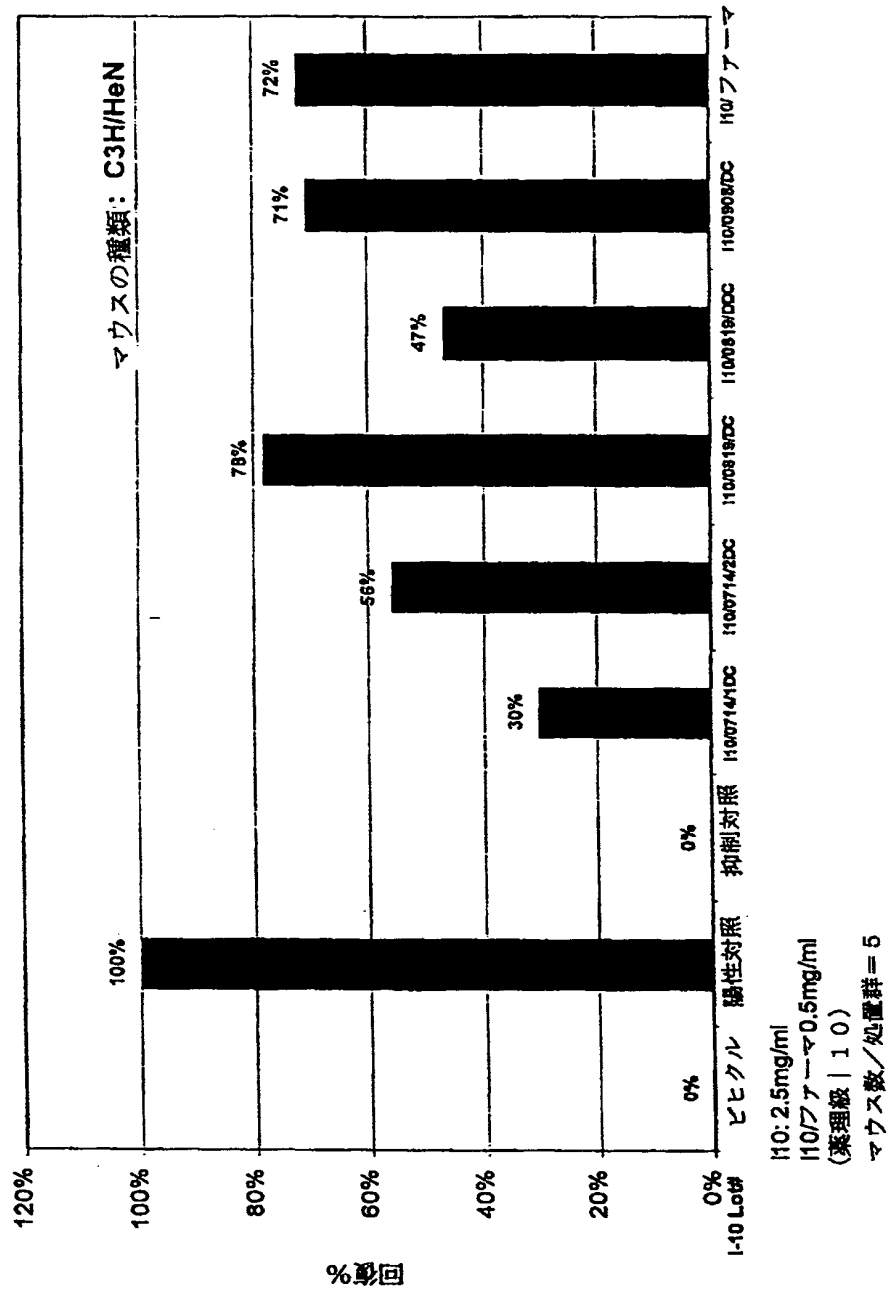
【図6】



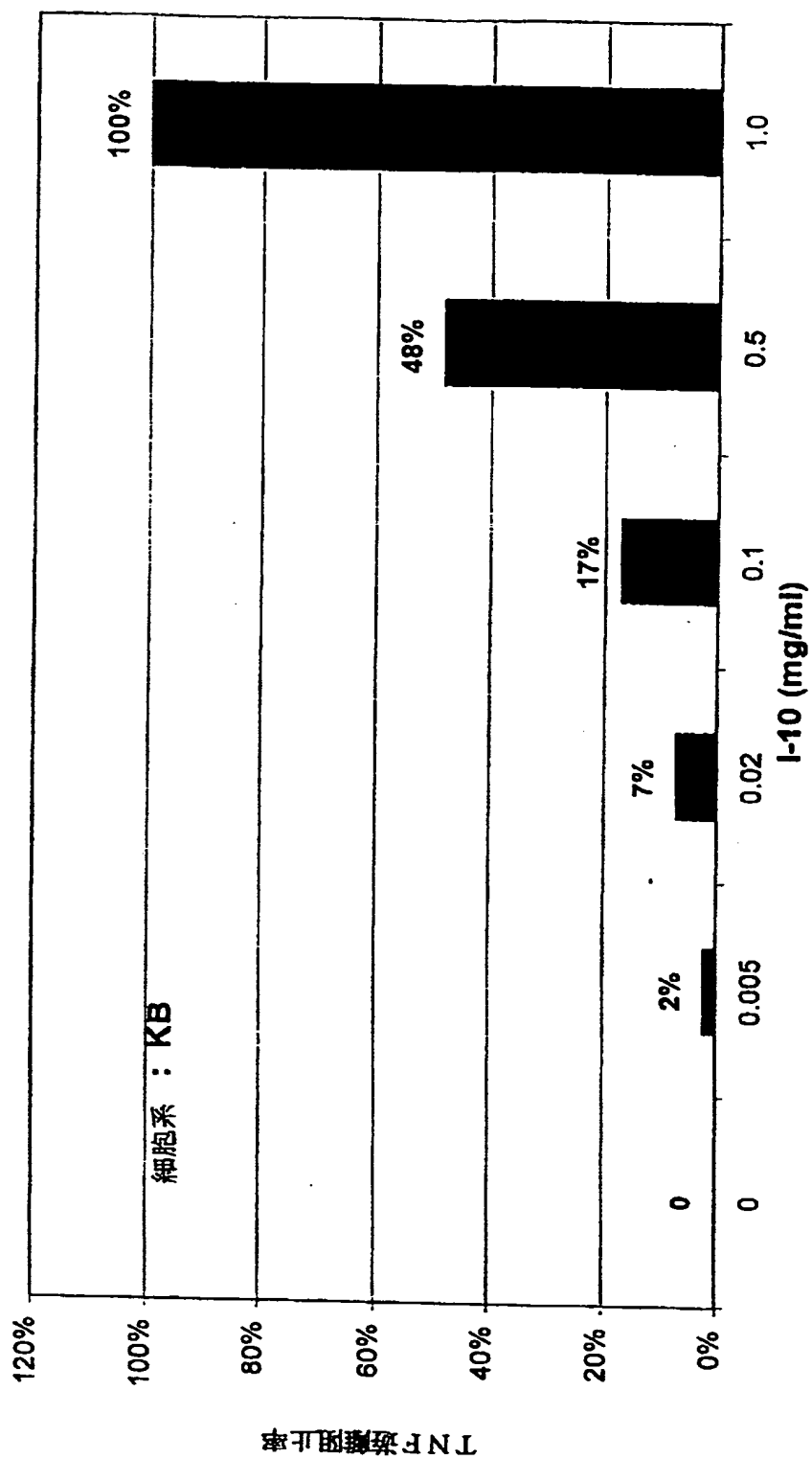
【図7】



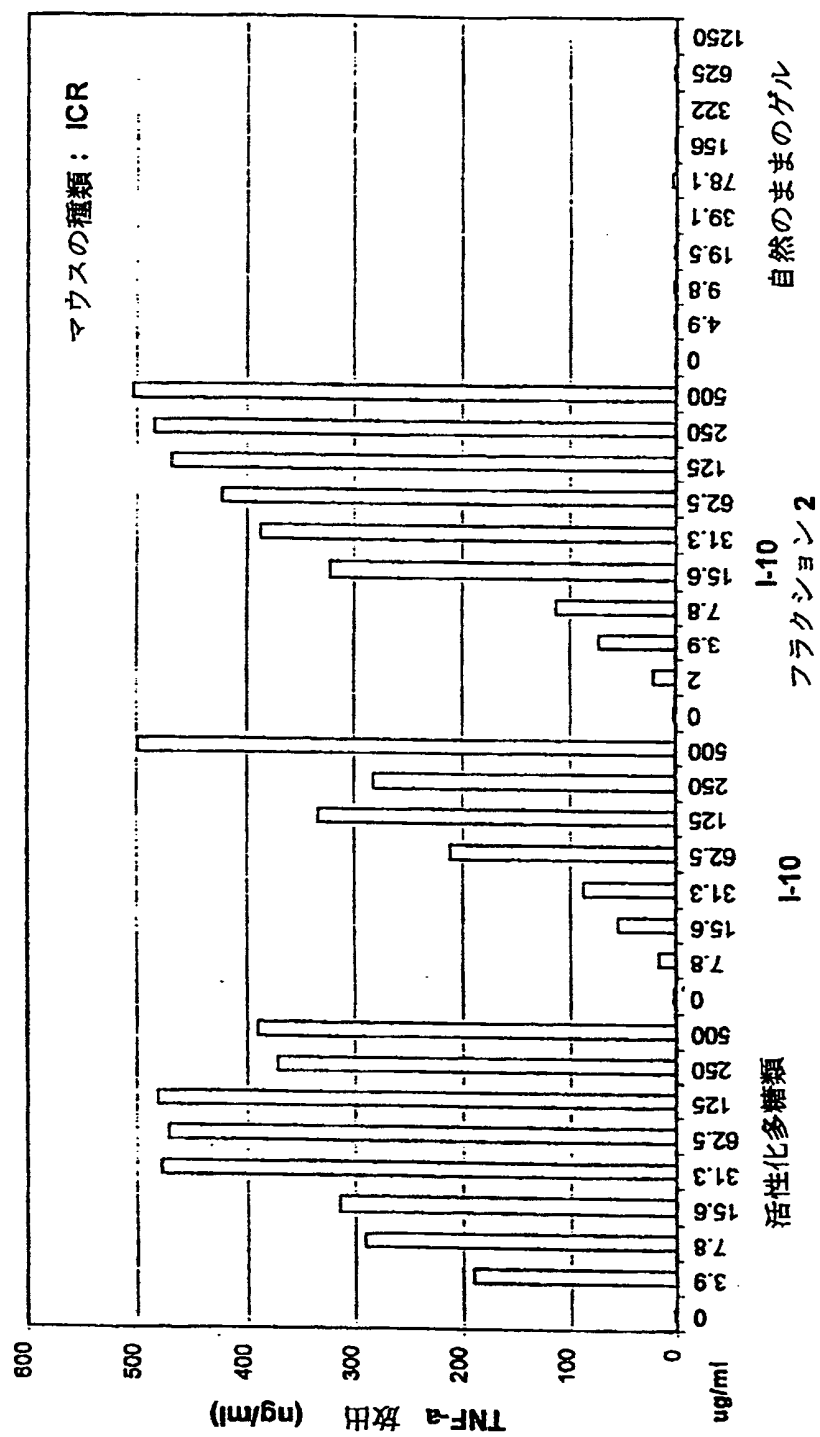
【図8】



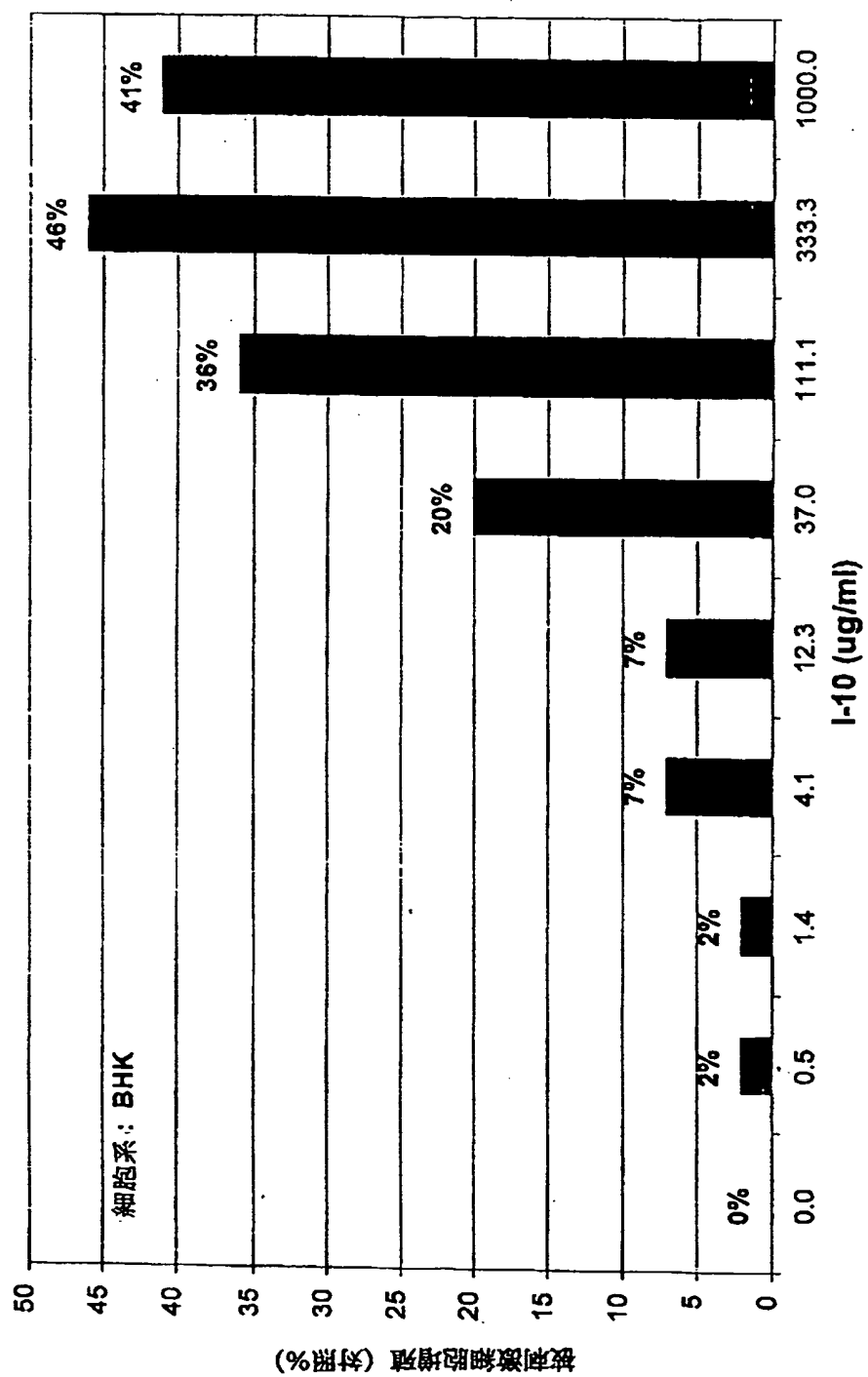
【図9】



マウスの種類：ICR



【図11】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/21361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12P 19/14, 19/04; A61K 31/715; C08B 37/00
US CL : 435/99, 101, 274; 514/54; 536/123, 123.1, 128

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/99, 101, 274; 514/54; 536/123, 123.1, 128

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/DS

search terms: aloe, polysaccharide, pectinase, pectin esterase, mannanase, cellulase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,735,935 A (MCANALLEY et al.) 05 April 1988, see the whole document, especially columns 37, 38, 65 and 66.	1-19
Y	US 5,441,943 A (MCANALLEY et al) 15 August 1995, col. 8, lines 40-49.	1-12
X, P	Chem. Abstr. Vol. 128, No. 19, 11 May 1998, page 974, column 1, the abstract No. 235122s, STRICKLAND, FAITH M. et al, 'Cytoprotective oligosaccharide from aloe preventing damage to the skin immune system by UV irradiation.' PCT Int. Appl. WO 98/09635, see the whole document.	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may show doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 DECEMBER 1998

Date of mailing of the international search report

11 JAN 1999

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

FRANCISCO C. PRATS

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JS98/21361

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chem. Abstr. Vol. 126, No. 15, 14 April 1997, page 328, col. 2, the abstract No. 197428v, SHIMIZU, YOSHINORI et al. 'Promotion of pea stem elongation by the fragments of plant cell wall oligosaccharides.' Mokuzai Gakkaishi 1997 43(2), 121-127 (Eng), see the whole document.	1-12
X	Chem. Abstr. Vol. 83, No. 11, 15 September 1975, page 313, column 1, the abstract No. 93833a, OVODOVA, R.G. et al, 'Polysaccharides of Aloe arborescens.' Khim. Priir. Soedin. 1975 11(1), 3-5 (Russ), see the whole document.	1-12

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム(参考)
C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00	Q
C 1 2 P 19/04		C 1 2 P 19/04	Z
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), JP, KR, U S		
Fターム(参考)	4B064 AF12 CA21 CB07 CC03 CC05 CC06 CD22 DA01 4C086 AA02 AA03 AA04 EA21 ZA89 ZB01 ZB09 4C090 AA01 AA04 AA09 BB10 BB13 BB14 BB33 BB36 CA31 DA23		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)